

**Immunochemische Untersuchungen zur Topographie  
der Proteine im Ribosom  
von Escherichia coli**

**Inaugural-Dissertation**  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie (23)  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Heinz Zeichhardt**  
aus Berlin  
1976





**Immunochemische Untersuchungen zur Topographie  
der Proteine im Ribosom  
von Escherichia coli**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie (23)  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Heinz Zeichhardt**

aus Berlin

1976



1. Referent: Priv.-Doz. Dr. G. Stöffler
2. Referent: Professor Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: **10.5.1976**

Gedruckt mit Unterstützung der Ernst-Reuter-Gesellschaft der Förderer  
und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.



Meinen Eltern  
und  
Christiane



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546604\\_0051](https://archive.org/details/IA41546604_0051)

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>A. Zusammenfassung</u>                                                                                                 | 10 |
| <u>B. Einleitung</u>                                                                                                      | 12 |
| 1. Der ribosomale Funktionszyklus                                                                                         | 12 |
| 1.1. Die Initiation                                                                                                       | 12 |
| 1.2. Die Elongation                                                                                                       | 13 |
| 1.3. Die Termination                                                                                                      | 14 |
| 2. Die Komponenten des Ribosoms                                                                                           | 14 |
| 2.1. Ribosomale RNS                                                                                                       | 15 |
| 2.2. Ribosomale Proteine                                                                                                  | 15 |
| 3. Die Rolle einzelner ribosomaler Komponenten für die Funktion des Ribosoms - Aussagen zur Topographie des Ribosoms      | 17 |
| 3.1. Rekonstitutionsversuche                                                                                              | 18 |
| 3.2. Antibiotikaresistenz und Ribosomen                                                                                   | 21 |
| 3.3. Chemische Modifikation von ribosomalen Proteinen                                                                     | 24 |
| 3.4. Affinitätsmarkierung von Ribosomen                                                                                   | 25 |
| 3.5. Immunologische Untersuchungen                                                                                        | 25 |
| 4. Thematik der vorliegenden Arbeit                                                                                       | 27 |
| 5. Einige immunologische Grundlagen                                                                                       | 28 |
| <u>C. Materialien und Methoden</u>                                                                                        | 32 |
| 1. Verwendete Puffer                                                                                                      | 32 |
| 2. Zellen                                                                                                                 | 33 |
| 3. Präparation von Ribosomen                                                                                              | 34 |
| 4. Präparation von 30S Untereinheiten mit radioaktiv markiertem Protein S5 oder S8                                        | 35 |
| 5. Vernetzung ribosomaler Proteine <u>in situ</u> durch bifunktionelle Reagenzien                                         | 36 |
| 5.1. Reaktion von 30S Untereinheiten mit PDM                                                                              | 36 |
| 5.2. Reaktion von 30S Untereinheiten mit DMA                                                                              | 37 |
| 6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                                                                        | 38 |
| 7. Immunologische Methoden                                                                                                | 39 |
| 7.1. Präparation von Antiseren, unfraktionierten $\gamma$ -Globulinen und IgG-Antikörpern gegen ribosomale Einzelproteine | 39 |
| 7.2. Zweidimensionale Immuno-Doppeldiffusionsmethode                                                                      | 40 |
| 7.3. Absorption von Antikörperpräparationen mit dem jeweils homologen Protein                                             | 41 |
| 7.4. Fraktionierung von Ribosomen-Antikörper-Komplexen mittels Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation                  | 41 |



|                     |                                                                                                                                                                    |     |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.4.1.              | 30S Untereinheiten-Antikörper-Komplexe                                                                                                                             | 41  |
| 7.4.2.              | 50S Untereinheiten-Antikörper-Komplexe                                                                                                                             | 42  |
| 7.4.3.              | 70S Ribosomen-Antikörper-Komplexe                                                                                                                                  | 42  |
| 7.4.4.              | Quantitative Abschätzung der beobachteten Reaktions-<br>effekte bei Versuchen mit unmarkierten Ribosomen anhand<br>von Standardtrennungsprofilen                   | 43  |
| 7.5.                | Fraktionierung von Protein-Antikörper-Komplexen mittels<br>Säulenchromatographie                                                                                   | 44  |
| 7.6.                | Immunelektronenmikroskopie                                                                                                                                         | 44  |
| 7.6.1.              | Präparation von Proben für die Elektronenmikroskopie                                                                                                               | 44  |
| 7.6.2.              | Elektronenmikroskopie                                                                                                                                              | 45  |
| <u>D. Resultate</u> |                                                                                                                                                                    | 46  |
| I.                  | Erreichbarkeit ribosomaler Proteine <u>in situ</u> für<br>spezifische Antikörper                                                                                   | 46  |
| I.1.                | Einleitung                                                                                                                                                         | 46  |
| I.2.                | Ergebnisse                                                                                                                                                         | 46  |
| I.2.1.              | Auswahl der für die erste Versuchsserie verwendeten<br>Antisera                                                                                                    | 46  |
| I.2.2.              | Inkubation von 30S Untereinheiten mit Antikörpern                                                                                                                  | 47  |
| I.2.3.              | Inkubation von 50S Untereinheiten mit Antikörpern                                                                                                                  | 52  |
| I.2.4.              | Variabilität der Ribosomen-Antikörper-Reaktion                                                                                                                     | 65  |
| I.2.4.1.            | Reaktionsabhängigkeit von der Antikörperkonzentration                                                                                                              | 65  |
| I.2.4.2.            | Abhängigkeit der Ribosomen-Antikörper-Reaktion von der<br>individualspezifischen Immunantwort der Tiere                                                            | 70  |
| I.2.4.3.            | Verwendung von unfractioniertem $\gamma$ -Globulin                                                                                                                 | 73  |
| I.2.4.4.            | Zusammenfassung und Schlußfolgerung                                                                                                                                | 74  |
| I.2.5.              | Inkubation von dissoziierten, radioaktiv markierten<br>Ribosomen mit Antikörpern                                                                                   | 75  |
| I.2.6.              | Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter<br>70S Ribosomen                                                                                           | 80  |
| I.2.6.1.            | Zugänglichkeit ribosomaler Proteine in undissoziierten<br>70S Ribosomen                                                                                            | 80  |
| I.2.6.2.            | Vergleich der Proteinzugänglichkeit in isolierten Unter-<br>einheiten und undissoziierten 70S Ribosomen                                                            | 94  |
| I.3.                | Diskussion                                                                                                                                                         | 103 |
| I.3.1.              | Grundlagen und Eigenschaften der Ribosomen-Antikörper-<br>Reaktion                                                                                                 | 103 |
| I.3.1.1.            | Natur der reaktiven antigenen Determinanten ribosomaler<br>Proteine                                                                                                | 103 |
| I.3.1.2.            | Die Zugänglichkeit antigener Determinanten an der Ribo-<br>somenoberfläche, ihre Reaktivität mit Antikörpern und<br>die Bildung von Ribosomen-Antikörper-Komplexen | 106 |

|             |                                                                                                                                     |     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I.3.2.      | Proteinstöchiometrie und Proteinzugänglichkeit                                                                                      | 111 |
| I.3.3.      | Die Reaktivität der 30S-ribosomalen Proteine in isolierten 30S Untereinheiten und dissoziierten Ribosomen                           | 119 |
| I.3.4.      | Einschränkungen bei der Versuchsinterpretation                                                                                      | 121 |
| I.3.5.      | Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren                                                                                           | 126 |
| I.3.5.1.    | Immunologische Experimente                                                                                                          | 126 |
| I.3.5.2.    | Physikochemische Versuche                                                                                                           | 129 |
| I.3.5.3.    | Chemische Modifikation                                                                                                              | 130 |
| I.3.5.4.    | Tryptische Verdauung                                                                                                                | 136 |
| I.3.6.      | Zusammenfassung                                                                                                                     | 136 |
| II.         | Vernetzung ribosomaler Proteine in situ durch bifunktionelle Reagenzien - Immunologische Identifizierung von benachbarten Proteinen | 140 |
| II.1.       | Einleitung                                                                                                                          | 140 |
| II.2.       | Ergebnisse                                                                                                                          | 141 |
| II.2.1.     | Nachweis der Nachbarschaft von S18 und S21 in der 30S Untereinheit                                                                  | 141 |
| II.2.1.1.   | Gelelektrophoretische und säulenchromatographische Darstellung des Komplexes PDM 1                                                  | 141 |
| II.2.1.2.   | Immunologische Identifizierung des Komplexes PDM 1                                                                                  | 144 |
| II.2.2.     | Nachweis der Nachbarschaft von S5 und S8 in der 30S Untereinheit                                                                    | 145 |
| II.2.2.1.   | Versuche mit unmarkierten Untereinheiten                                                                                            | 145 |
| II.2.2.1.1. | Gelelektrophoretische und säulenchromatographische Darstellung eines Komplexes (DMA 1)                                              | 145 |
| II.2.2.1.2. | Immunologische Identifizierung des DMA 1-Komplexes                                                                                  | 147 |
| II.2.2.2.   | Versuche mit radioaktiv markierten Untereinheiten                                                                                   | 149 |
| II.2.2.2.1. | Gelelektrophoretische Darstellung des DMA 1-Komplexes                                                                               | 149 |
| II.2.2.2.2. | Immunologische Identifizierung des DMA 1-Komplexes                                                                                  | 150 |
| II.3.       | Diskussion                                                                                                                          | 155 |
| II.3.1.     | Eigenschaften und Limitationen der Vernetzungstechnik und Charakterisierungsmethoden                                                | 155 |
| II.3.2.     | Vernetzungsexperimente anderer Autoren                                                                                              | 161 |
| III.        | Immunoelektronenmikroskopische Lokalisation ribosomaler Proteine auf der Ribosomenoberfläche                                        | 185 |
| III.1.      | Einleitung                                                                                                                          | 185 |
| III.2.      | Ergebnisse                                                                                                                          | 186 |
| III.2.1.    | Die Form der 30S- und 50S-ribosomalen Untereinheiten                                                                                | 186 |
| III.2.1.1.  | Die 30S Untereinheit                                                                                                                | 186 |
| III.2.1.2.  | Die 50S Untereinheit                                                                                                                | 189 |

|                            |                                                                                                                                                                       |     |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.2.2.                   | Lokalisation der Proteine S5, S13 und S14 in 30S-IgG-30S-Komplexen                                                                                                    | 192 |
| III.2.2.1.                 | S5 ist mit drei Bindungsstellen in der "Hals-Region" der zweigeteilten 30S Untereinheit gelegen                                                                       | 193 |
| III.2.2.2.                 | S13 und S14 sind im "Kopf" der 30S Untereinheit in benachbarten Positionen gelegen                                                                                    | 196 |
| III.2.2.3.                 | Ein dreidimensionales Modell der 30S Untereinheit                                                                                                                     | 198 |
| III.2.3.                   | Lokalisation der Proteine L14, L17, L18, L19, L22 und L23 in 50S-Antikörper-50S-Komplexen                                                                             | 201 |
| III.2.3.1.                 | L17 und L22 sind auf der konvexen Seite der "Nieren-Form" gelegen                                                                                                     | 201 |
| III.2.3.2.                 | L14, L19 und L23 sind auf der konkaven Seite der "Nieren-Form" gelegen                                                                                                | 204 |
| III.2.3.3.                 | L18 liegt an einer der lateralen Protuberanzen der "Kronen-Form"                                                                                                      | 208 |
| III.2.3.4.                 | Ein dreidimensionales Modell der 50S Untereinheit                                                                                                                     | 210 |
| III.3.                     | Diskussion                                                                                                                                                            | 213 |
| III.3.1.                   | Form der Untereinheiten                                                                                                                                               | 213 |
| III.3.2.                   | Eigenschaften und Limitationen der immunelektronenmikroskopischen Studien                                                                                             | 215 |
| III.3.3.                   | Ortsangaben für weitere Proteine im Ribosom                                                                                                                           | 217 |
| <u>E. Schlußdiskussion</u> |                                                                                                                                                                       | 219 |
| 1.                         | Der Beitrag der drei angewendeten Versuchsmethoden zur Aufklärung der Ribosomenstruktur                                                                               | 219 |
| 1.1.                       | Aussagen über Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich und unterschiedliche Konformationen der Subpartikel in Abhängigkeit von dissoziiertem und reassoziertem Zustand | 219 |
| 1.2.                       | Aussagen über die Form der Proteine innerhalb des Ribosoms                                                                                                            | 233 |
| 1.3.                       | Aussagen über die Nachbarschaft von Proteinen und ihre Verteilung im Ribosom                                                                                          | 239 |
| 2.                         | Weitere Ergebnisse über die räumliche Proteinanordnung im Ribosom                                                                                                     | 245 |
| 2.1.                       | Ribonukleoprotein-Fragmente - Aussagen über Protein-RNS-Wechselwirkungen und Proteinnachbarschaften                                                                   | 245 |
| 2.2.                       | Funktionsabgeleitete Proteinnachbarschaften                                                                                                                           | 253 |
| 2.2.1.                     | Die "Assembly Map" - Aussagen über Proteinnachbarschaften                                                                                                             | 255 |
| 2.2.2.                     | Nachbarschaften an der mRNS-Bindungsstelle                                                                                                                            | 255 |
| 2.2.3.                     | Nachbarschaften an den tRNS-Bindungsstellen                                                                                                                           | 259 |
| 2.2.4.                     | Nachbarschaften an der "Fidelity Gruppe"                                                                                                                              | 264 |
| 2.2.5.                     | Nachbarschaften am Peptidyltransferase-Zentrum                                                                                                                        | 266 |

|                                                          |                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.6.                                                   | Nachbarschaften an den Faktorenbindungsstellen<br>und dem GTPase-Zentrum | 268 |
| 3.                                                       | Schlußbetrachtung                                                        | 270 |
| <u>F. Literaturverzeichnis</u>                           |                                                                          | 272 |
| <u>G. Seitenverzeichnis für Abbildungen und Tabellen</u> |                                                                          | 295 |
| <u>H. Lebenslauf</u>                                     |                                                                          | 297 |



## A. Zusammenfassung

Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ribosomale Einzelproteine wurden Untersuchungen zur Topographie der Proteine im Ribosom von *Escherichia coli* durchgeführt:

1. Antikörperbindungsstudien zeigten, daß alle Proteine auf der Oberfläche isolierter 30S und 50S Untereinheiten zur Reaktion mit Antikörpern zugänglich sind. Auf der Oberfläche undissoziierter 70S Ribosomen werden alle Proteine außer L19 von Antikörpern erreicht. Einige Proteine sind in isolierten Untereinheiten und undissoziierten 70S Ribosomen graduell unterschiedlich zugänglich. 50S Untereinheiten enthalten nach Dissoziation der 70S Ribosomen in geringen Mengen Proteine der 30S Untereinheit (S9, S11, S12, S14, S16, S19 und S21).
2. Zur Aufklärung von Proteinnachbarschaften im Ribosom wurden Proteine in intakten 30S Untereinheiten durch bifunktionelle Reagenzien verknüpft. Mit Hilfe proteinspezifischer Antikörper konnten zwei Proteinpaaare identifiziert werden: Das durch N,N'-p-Phenylmaleinimid (PDM) gebildete Aggregat S18-S21 und der durch Dimethyladipimidat Dihydrochlorid (DMA) gebildete Komplex S5-S8.
3. Mit Antikörpern der Immunglobulin G-Klasse (IgGs) wurden Ribosomen-IgG-Ribosomen-Komplexe ("Dimere") hergestellt. Die elektronenmikroskopische Lokalisation der Antikörperansatzstellen auf der Ribosomenoberfläche führte zu Aussagen über die Positionen der Proteine S5, S13, S14, L14, L17, L18, L19, L22 und L23 in den zugehörigen Untereinheiten.
  - a. Die elektronenoptisch gestreckt erscheinende 30S Subpartikel ist zweigeteilt; ein kleiner "Kopf" ist von einem großen "Körper" abgesetzt. Das Protein S5 liegt mit drei Antikörperansatzstellen in dem sich verjüngenden Abschnitt zwischen "Kopf" und "Körper", der "Halsregion". S13 und S14 kommen in benachbarten Positionen am Scheitel des "Kopfes" vor.
  - b. Die 50S Untereinheit tritt als "Kronen-" und "Nieren-Form" auf. Die Proteine L14, L19 und L23 werden in der Kerbe der "Nieren" bzw. im "Sitz" der "sesselförmigen Krone" durch Antikörper markiert. L17 und L22 liegen auf der konvexen Seite der "Nieme" bzw. der "Kronen-Rückansicht". L18 nimmt eine Position auf einer der seitlichen Protuberanzen der "Krone" ein.

Für die 30S und 50S Untereinheit wurden Grundmodelle abgeleitet, in die sich alle nachgewiesenen Projektionen der Partikel einfügen lassen. Dreidimensionale Modelle beider Untereinheiten mit den Positionen von insgesamt neun Proteinen werden präsentiert.

4. Die Kombination der Resultate erlaubte unter Berücksichtigung von Literaturdaten folgende Aussagen:
  - a. Die Proteine S9, S10, S11, S12, S14, S16, S20, S21, L1, L2, L6, L11, L14, L15, L19, L20, L23, L26 und L27 liegen im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter 70S Ribosomen oder dessen unmittelbarer Nähe. Von diesen Proteinen werden S9, S11, S12, S14, S16 und S21 bei der Dissoziation in Untereinheiten auf beide Subpartikel verteilt.
  - b. Die Untereinheiten weisen in dissoziiertem Zustand (d.h. als isolierte Subpartikel) und reassoziertem Zustand (d.h. als Bestandteil von 70S Ribosomen) unterschiedliche Konformationen auf.
  - c. Mehrere Proteine im Ribosom besitzen eine gestreckte Gestalt.
5. Es wurden Proteinzugänglichkeit, -nachbarschaft und -verteilung im Ribosom diskutiert und vorläufige dreidimensionale Zuordnungen von Funktionszentren zu Strukturmerkmalen des Ribosoms vorgenommen.

## B. Einleitung

Das von F. Crick (1958) formulierte zentrale Dogma der Genetik

DNS    Transkription →    RNS    Translation →    Protein

beschreibt die Richtung der Informationsübertragung bei der Proteinbiosynthese in der Zelle.

Während des ersten Schrittes, der Transkription, wird die in der DNS gespeicherte Information mit Hilfe eines Enzyms, der DNS-abhängigen RNS-Polymerase, in ein RNS-Molekül umgesetzt, das der DNS komplementär ist. Diese RNS wird Boten- oder Messenger-RNS (mRNS) genannt (Übersichtsarbeiten von Chamberlin, 1970; Zillig et al., 1970; Burgess, 1971).

Beim zweiten Schritt, der Translation, wird eine spezifische Nukleotidsequenz der mRNS nach den Regeln des genetischen Codes in eine entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Ein koordiniertes Zusammenspiel von mRNS, aminosäurebeladenen Transfer-RNS-Molekülen (tRNS), Proteinfaktoren und Ribosomen ermöglicht die Synthese neuer Proteine (Übersichtsarbeiten von Lucas-Lenard und Lipmann, 1971; Haselkorn und Rothman-Denes, 1973).

Ribosomen bauen sich aus RNS und Proteinen auf. Sie werden entsprechend ihrem Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge klassifiziert. Prokaryonten enthalten 70S Ribosomen, die sich aus zwei ungleichen Partikeln, den 30S und 50S Untereinheiten, zusammensetzen. Eukaryonten enthalten in ihrem Zytoplasma 80S Ribosomen, die aus je einer 40S und einer 60S Untereinheit bestehen. Da die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen topographischen Studien an 70S Ribosomen des Enterobakteriums *Escherichia coli* durchgeführt wurden, werden im Folgenden einige funktionelle und strukturelle Eigenschaften dieser Ribosomen vorgestellt.

### 1. Der ribosomale Funktionszyklus

Der Funktionszyklus läßt sich in drei Abschnitte gliedern:

#### 1.1. Die Initiation

Beim Synthesebeginn, der Initiation, kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen 30S Untereinheiten, mRNS und Formylmethionyl-tRNS ( $fMet-tRNS_f^{Met}$ ). Mit Hilfe von Initiationsfaktoren (IF1, IF2, IF3), wird ein spezifischer

Initiationskomplex gebildet. Diesen drei Proteinen werden folgende Funktionen zugeschrieben: Faktor IF3 dissoziiert 70S Ribosomen in 30S und 50S Untereinheiten und ermöglicht die Anlagerung von natürlicher mRNA mit dem Startcodon AUG an 30S Untereinheiten. Es ist fraglich, ob verschiedene IF3-Moleküle eine Selektion bestimmter mRNA-Spezies bedingen. Die Initiations-tRNA bindet unter Mitwirkung von IF1, IF2 und GTP an die 30S Untereinheit. Erst der Initiationskomplex "30S Untereinheit-mRNA-fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>" ist stabil. Nach der Bindung einer 50S Untereinheit und nach einer vom Faktor IF2 abhängigen GTP-Hydrolyse kommt es zur Akkommodation der Initiations-tRNA am Ribosom. Damit ist die Initiation abgeschlossen. Die Initiations-tRNA verbleibt in der "p-site" <sup>\*)</sup> des 70S Ribosoms (Übersichtsarbeiten von Revel, 1972; Rudland und Clark, 1972; Grunberg-Manago et al., 1973; Anderson et al., 1974).

## 1.2. Die Elongation

Die Elongation (Übersichtsarbeiten von Haenni, 1972; Leder, 1973) beginnt mit der Anlagerung einer Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) in die ribosomale "a-site" <sup>\*\*)</sup>. Die aa-tRNA wird dabei zusammen mit einem der drei Elongationsfaktoren, dem Proteinfaktor EF-Tu, und dem energieliefernden GTP in einem Komplex "EF-Tu·GTP·aa-tRNA" an das Ribosom gebunden. Unter Spaltung des GTP wird die aa-tRNA akkommodiert, d.h. sie wird gegenüber der benachbarten fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>, die sich in der "p-site" befindet, in eine günstigere Stellung gebracht, um die anschließende Knüpfung der Peptidbindung zu erleichtern. EF-Tu·GDP wird aus dem Komplex entlassen und mit Hilfe eines weiteren Elongationsfaktors, dem Protein EF-Ts, zu EF-Tu·GTP regeneriert, der damit der Bildung eines neuen EF-Tu·GTP·aa-tRNA-Komplexes zur Verfügung steht.

Es kommt nun zum eigentlichen katalytischen Schritt, zur Transpeptidierung. Die Peptidyltransferase der 50S Untereinheit spaltet ohne Energieverbrauch die Esterbindung zwischen fMet und der tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> in der "p-site" und verknüpft die freie Carboxylgruppe von fMet mit der α-Aminogruppe der aa-tRNA in der "a-site". Das Dipeptid ist nun mit der in der "a-site" vorliegenden tRNA verbunden, während die tRNA in der "p-site" unbeladen verbleibt. Der

---

<sup>\*)</sup> "p-site" = Peptidyl-tRNA-Bindungsstelle: Peptidyl- bzw. Formylmethionylreste dort gebundener tRNA-Moleküle reagieren mit dem Antibiotikum Puromycin.

<sup>\*\*)</sup> "a-site" = Aminoacyl-tRNA-Bindungsstelle: Aminoacylreste dort gebundener tRNA-Moleküle reagieren nicht mit Puromycin.



Proteinfaktor EF-G und GTP steuern die sich anschließende Translokation: Die mRNA wird relativ zum Ribosom um ein Triplet verschoben, die mit dem Dipeptid beladene tRNA aus der "a-site" in die "p-site" gerückt sowie die freie tRNA und - abhängig von der Hydrolyse des GTP - EF-G vom Ribosom entlassen. In die freie "a-site" kann wieder ein EF-Tu·GTP·aa-tRNA-Komplex binden. Dieser Zyklus wird so lange durchlaufen, bis auf der mRNA ein Terminationscodon auftaucht.

### 1.3. Die Termination

Terminationscodonen auf der mRNA sind die Triplets UAG, UAA oder UGA. Für diese Codonen gibt es im allgemeinen keine Aminoacyl-tRNA; die Peptidkette wird daher beim Transpeptidierungsschritt in eine leere "a-site" entlassen. Dieser Schritt wird wahrscheinlich - ähnlich wie während der Elongation - durch die Peptidyltransferase katalysiert. Drei Proteine, die Terminationsfaktoren RF1, RF2 und RF3 (im englischen Schrifttum "Release Factors" genannt), sind für die Freisetzung des fertigen Peptids und der unbeladenen tRNA verantwortlich. RF1 ist für die Terminationstriplets UAA bzw. UAG spezifisch, während RF2 die Termination bei UAA oder UGA vermittelt. RF3 unterstützt die Bindung des einen oder anderen Faktors an das Ribosom (Übersichtsarbeiten von Beaudet und Caskey, 1972; Caskey, 1973).

(Als weitere Übersichtsarbeiten über die Funktion von Prokaryonten-Ribosomen siehe: Caskey et al., 1972; Kurland, 1972, 1974a; Kurland et al., 1972a; Wittmann und Stöffler, 1972; Pongs et al., 1974; Stöffler, 1974. Aktuelle Übersichten verschiedener Autoren finden sich auch in "Ribosomes", herausgegeben von Nomura, Tissières und Lengyel, 1974.)

## 2. Die Komponenten des Ribosoms

70S Ribosomen dissoziieren bei niedriger  $Mg^{++}$ -Konzentration in ihre beiden Untereinheiten. Erhöhung der  $Mg^{++}$ -Konzentration bewirkt eine Reassoziierung der Subpartikel zu 70S Monomeren (Debey et al., 1975; Wishnia et al., 1975; Übersichten bei Noll et al., 1973 und Spirin, 1974). Ribosomen und ribosomale Untereinheiten sind Ribonukleoprotein-Partikel, die zu 33% aus Proteinen und zu 67% aus ribosomaler rRNA bestehen (Tissières et al., 1959; Kurland, 1966). Das undissoziierte 70S Ribosom hat ein Molekulargewicht von  $2,65 \times 10^6$  Dalton. Das Molekulargewicht für die 30S Untereinheit beträgt  $0,9 \times 10^6$  Dalton, für die 50S Untereinheit  $1,55 \times 10^6$  Dalton (Hill et al., 1969a).

(Als Übersichtsarbeiten über den Aufbau von Prokaryonten-Ribosomen siehe: Kurland, 1972, 1974a; Kurland et al., 1972a; Wittmann, 1972, 1974; Wittmann und Stöffler, 1972; Garrett und Wittmann, 1973a, b; Nomura, 1973; Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974. Weitere Übersichten sind in "Ribosomes" zu finden, herausgegeben von Nomura, Tissières und Lengyel, 1974.)

### 2.1. Ribosomale RNS

Die 30S Untereinheit enthält ein RNS-Molekül, das eine Sedimentationskonstante von 16S und ein Molekulargewicht von  $0,55 \times 10^6$  Dalton hat (Kurland, 1960; Midgley, 1965; Stanley und Bock, 1965). Die Sequenz der aus ca. 1600 Nukleotiden bestehenden 16S rRNS ist weitgehend aufgeklärt (Ehresmann et al., 1972, 1975; Fellner et al., 1972; zur Übersicht s. Fellner, 1974).

Zwei unterschiedlich große RNS-Moleküle kommen in 50S Untereinheiten vor, eine mit 23S und eine mit 5S sedimentierende RNS. Die 23S rRNS, deren Sequenz noch nicht völlig ermittelt ist, hat ein Molekulargewicht von  $1,1 \times 10^6$  Dalton (Kurland, 1960; Midgley, 1965; Stanley und Bock, 1965). Die 5S rRNS ist bereits sequenziert (120 Nukleotide); ihr Molekulargewicht beträgt  $4 \times 10^4$  Dalton (Rosset und Monier, 1963; Brownlee et al., 1968; zur Übersicht s. Monier, 1974).

Aufgrund verschiedener Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß die Sekundärstruktur ribosomaler RNS in intakten Ribosomen der isolierter rRNS entspricht. Mit Hilfe physiko-chemischer Untersuchungen ließ sich zeigen, daß die Nukleotide der rRNS in Ribosomen und in isoliertem Zustand jeweils zu 60-70% in doppelsträngigen RNS-Regionen basengepaart vorliegen (Blake und Peacocke, 1965; Cox, 1966; McPhie und Gratzer, 1966; Sarkar et al., 1967; Cotter und Gratzer, 1969; Thomas, 1969).

### 2.2. Ribosomale Proteine

Im E. coli-Ribosom kommen mehr als 50 verschiedene Proteine vor: In der 30S Untereinheit 21, in der 50S Untereinheit 34 Proteine (Hardy et al., 1969; Nomura et al., 1969; Traut et al., 1969; Kaltschmidt und Wittmann, 1970b; Hindennach et al., 1971a,b; Mora et al., 1971; Wittmann et al., 1971; Wittmann, 1974). Die Nomenklatur der ribosomalen Einzelproteine beruht auf ihrem Wanderungsverhalten in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a). Die 21 Proteine der 30S (kleinen oder "small")

Untereinheit werden S1, S2, ..., S21 genannt, die 34 Proteine der SOS (großen oder "large") Untereinheit als L1, L2, ..., L34 bezeichnet (Wittmann et al., 1971; Wittmann, 1974).

Die Proteine wurden mit chemischen, physikalischen und immunologischen Methoden charakterisiert (Craven et al., 1969; Kaltschmidt et al., 1970; Dzionara et al., 1970; Kaltschmidt, 1971; Mora et al., 1971; Rombauts et al., 1971; Stöffler und Wittmann, 1971a, b; Wittmann-Liebold, 1973a, b; zur Übersicht s. Wittmann, 1974, sowie Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974):

Die Molekulargewichte der einzelnen Proteine liegen im allgemeinen zwischen ca. 7000 und 31000 Dalton (s. auch die folgenden Referenzen zu den Primärstrukturstudien). Die einzige Ausnahme ist Protein S1 mit 65000 Dalton.

Die meisten Proteine sind basisch und haben ihren isoelektrischen Punkt bei pH 8-12. Für sieben Proteine (S1, S2, S10, L4, L8, L9, L10) liegen die isoelektrischen Punkte zwischen pH 5 und 8 und für nur drei Proteine (S6, L7, L12) unter pH 5.

53 der 55 ribosomalen Proteine unterscheiden sich in ihren Aminosäurekompositionen, tryptischen Peptiden und immunologischen Eigenschaften. Lediglich bei zwei Proteinpaares treten Ähnlichkeiten auf. Die Proteine S20 und L26 haben gleiche Aminosäurezusammensetzungen und zeigen vollständige immunologische Kreuzreaktion (Tischendorf, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Proteine L7 und L12, die immunologisch ebenfalls nicht unterscheidbar sind, weisen nahezu identische Aminosäuresequenzen auf; L7 ist jedoch im Gegensatz zu L12 am N-Terminus acetyliert (Terhorst et al., 1973).

Die Primärstrukturen von 14 Proteinen (S4, S6, S8, S9, S18, S21, L7, L12, L18, L25, L27, L29, L30 und L32) sind bereits vollkommen und von fast allen übrigen Proteinen teilweise aufgeklärt (Terhorst et al., 1973; Wittmann-Liebold, 1973a, b; Stadler, 1974; Yaguchi et al., 1974; Bitar, 1975; Bitar und Wittmann-Liebold, 1975; Brosius et al., 1975; Chen et al., 1975; Chen und Wittmann-Liebold, 1975; Dovgas et al., 1975; Hitz et al., 1975; Ritter und Wittmann-Liebold, 1975; Schiltz und Reinbolt, 1975; Vandekerckhove et al., 1975; Wittmann-Liebold et al., 1975; Yaguchi, 1975; zur Übersicht s. Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974, sowie Wittmann-Liebold und Dzionara, 1975).

Einblick in die Sekundärstruktur der ribosomalen Proteine wurde auf zweifache Weise gewonnen: Die Kenntnis der Primärstrukturen ermöglichte, die hypothetischen Anteile von  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Struktur in den entsprechenden Proteinen zu bestimmen; dabei wurden gewisse Regeln über die von der

Aminosäuresequenz abhängige Proteinfaltung berücksichtigt (Chou und Fasman, 1974a, b). Experimentellen Aufschluß erbrachten physiko-chemische Untersuchungen (Cotter et al., 1967; Sarkar et al., 1967; Dzionara, 1970; Möller et al., 1970). Die Autoren zeigten, daß der  $\alpha$ -Helix-Gehalt des Gesamtproteinanteils sowohl im intakten Ribosom, also in situ, als auch in isoliertem Zustand bei ca 25% liegt. In isolierten Proteinen beträgt der Anteil  $\alpha$ -helikaler Bereiche im allgemeinen 20-40%, bei den Proteinen L7 und L12 sogar 50-60%.

Erste Aussagen zur Tertiärstruktur ribosomaler Proteine erlaubten hydrodynamische Untersuchungen und Röntgen-Kleinwinkelstreuungsanalysen von Einzelproteinen. Mehrere Proteine weisen in isoliertem Zustand elongierte bis extrem gestreckte Konformationen auf (Wong und Paradies, 1974; Paradies, persönliche Mitteilung). Ergebnisse aus Antikörperbindungsstudien und immun-elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß zumindest einige Proteine auch im Ribosom gestreckt vorliegen (s. Abschnitt 1.2. der Schlußdiskussion).

Die stöchiometrischen Verhältnisse der Proteine im intakten Ribosom wurden zuerst von Voynow und Kurland (1971) und Weber (1972) untersucht. Die Autoren zeigten, daß die Mehrzahl der Proteine mit einer Kopie pro entsprechender Untereinheit, einige Proteine mit weniger als einer Kopie und (nur in der 50S Untereinheit) einige Proteine mit mehreren Kopien vorkommen. Aus dieser ungleichmäßigen Proteinverteilung wurde gefolgert, daß die Ribosomen strukturell heterogen sind. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen von Hardy (1975) ließen dagegen auf einen wesentlich homogenen Aufbau der Ribosomen schließen. Für nahezu alle Proteine wurde nachgewiesen, daß sie in einfacher Ausfertigung im Ribosom auftreten. Lediglich für die Proteine L7 und L12 wurde - in Übereinstimmung mit Resultaten von Möller et al. (1972), Weber (1972) und Thanmana et al. (1973) - gezeigt, daß sie zusammen mit wenigstens zwei Kopien pro Ribosom vorliegen.

### 3. Die Rolle einzelner ribosomaler Komponenten für die Funktion des Ribosoms - Aussagen zur Topographie des Ribosoms

Einige repräsentative Beispiele werden angeführt, um die verschiedenen Wege zur Aufklärung funktioneller und struktureller Zusammenhänge aufzuzeigen.



### 3.1. Rekonstitutionsversuche

#### a. Totale Rekonstitution

Traub und Nomura gelang es bereits 1968, funktionell aktive 30S Untereinheiten aus isolierten ribosomalen Proteinen und reiner 16S rRNS zu rekonstituieren (als Übersichten s. Nomura et al., 1969; Nomura, 1970, 1973, 1974; Nomura und Held, 1974). Diese Untersuchungen ergaben eindeutig, daß die Komponenten der 30S Untereinheit die Information zum Zusammenbau selbst enthalten, und erlaubten in der Folge aussagekräftige Experimente zum Verständnis der Funktion und Struktur des Ribosoms.

Durch Weglassen eines einzelnen Proteins aus dem Rekonstitutionsgemisch wurde bestimmt, wie sich das Fehlen des jeweiligen Proteins auf die strukturelle Integrität des Ribosoms und seine Funktion auswirkt. Es zeigte sich, daß zum Zusammenbau (=assembly) von physikalisch intakten Untereinheiten, die mit 30S sedimentieren, die Anwesenheit bestimmter Proteine bei der Rekonstitution notwendig ist (Nomura et al., 1969; Held et al., 1973). Für insgesamt zehn Proteine wurde ermittelt, daß beim Fehlen jeweils eines dieser Proteine keine kompletten Untereinheiten gebildet werden. Analyse der Proteinkomposition von derartigen Untereinheiten ergab, daß in den meisten Fällen in den Partikeln nicht nur das entsprechende Protein, sondern eine Vielzahl von Proteinen fehlt. Durch die Abwesenheit bestimmter Proteine wird also der Einbau anderer Proteine in die 30S Untereinheit verhindert, was auf kooperative Reaktionen zwischen den Proteinen bei der Rekonstitution schließen läßt. In weiterführenden Rekonstitutionsstudien wurde bestimmt, welches Protein den Einbau eines anderen ermöglicht. Die Ergebnisse führten zur sogenannten "Assembly Map" (s. Abb. 48), die neben den Protein-Protein-Wechselwirkungen die Protein-16S rRNS-Interaktionen und die mögliche Einbaufolge der Proteine bei der Rekonstitution wiedergibt (Mizushima und Nomura, 1970; Held et al., 1974; Green und Kurland, 1973; Craven et al., 1974; zur Übersicht s. Nomura, 1973, 1974; Kurland, 1974b). Es wurde angenommen, daß Proteine, die sich beim Zusammenbau beeinflussen, im intakten Ribosom benachbart vorliegen.

Die funktionellen Eigenschaften von Untereinheiten, bei deren Rekonstitution jeweils ein Protein weggelassen war, wurden in mehreren Systemen ermittelt (tRNS-Bindung, Polypeptidsynthese in Abhängigkeit synthetischer oder natürlicher mRNS) (Nomura et al., 1969; Held et al., 1973). Die Zuordnung bestimmter Teilfunktionen zu einzelnen Proteinen erwies sich in vielen Fällen

als schwierig: Durch Weglassen eines Einzelproteins wird selbst bei Rekonstitution zu Partikeln, die mit 30S sedimentieren, im allgemeinen eine Verminderung mehrerer bzw. aller Funktionen bewirkt. Diese Resultate lassen eine hohe Kooperativität zwischen den Proteinen für die funktionelle Aktivität von 30S Untereinheiten erkennen.

In derartigen Testen konnte für die Proteine S11 und S12 ein Beitrag an der Übersetzungsgenauigkeit des Ribosoms ("Fidelity") nachgewiesen werden (Nomura et al., 1969; Ozaki et al., 1969). In Gegenwart des Antibiotikums Streptomycin, das bei der Translation fehlerhaften Aminosäureeinbau ("Misreading") in die wachsende Peptidkette verursacht (Gorini et al., 1961; Davies et al., 1964), rufen 30S Untereinheiten ohne S12 eine genauere Übersetzung von mRNA als intakte 30S Untereinheiten hervor. Partikel ohne S11 bewirken dagegen eine erhöhte Fehleinbaurate. Nach diesen Befunden wird die Übersetzungsgenauigkeit durch S11 erhöht und durch S12 vermindert. Die unmittelbaren antagonistischen Effekte von S11 und S12 auf die "Fidelity" lassen vermuten, daß die beiden Proteine im Ribosom benachbart vorliegen.

Vergleichbare Studien mit 50S Untereinheiten wurden bislang nicht durchgeführt: Zum einen ist die totale Rekonstitution von E. coli-50S Subpartikeln erst kürzlich gelungen (Nierhaus und Dohme, 1974), zum anderen konnte die von Nomura und Erdmann (1970) entwickelte totale Rekonstitution von 50S Untereinheiten aus *Bacillus stearothermophilus* nur beschränkt ausgenutzt werden, weil die Korrelation der ribosomalen Proteine aus beiden Organismen erst teilweise vorliegt (Isono et al., 1973; Higo et al., 1973; Geisser et al., 1973; Tischendorf et al., 1973).

## b. Partielle Rekonstitution

Durch Behandlung von Ribosomen mit CsCl, LiCl oder  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Äthanol können bestimmte Proteine von den Untereinheiten abgespalten werden ("Split Proteine") (Meselson et al., 1964; Hosokawa et al., 1966; Marcot-Queiroz und Monnier, 1966; Staehelin und Meselson, 1966; Lerman et al., 1966; Atsmon et al., 1967; Gesteland und Staehelin, 1967; Traub et al., 1967; Itoh et al., 1968; Staehelin et al., 1969; Homann und Nierhaus, 1971; Hamel et al., 1972; Nierhaus und Montejo, 1973; Schreiner und Nierhaus, 1973; Highland und Howard, 1975). Die verbleibenden Ribonukleoprotein-(RNP-)Partikel ("Core Partikel") lassen sich durch Inkubation mit den "Split Proteinen" wieder zu physikalisch und funktionell intakten Untereinheiten rekonstituieren. Durch

Rückbinden der "Split Proteine" - einzeln oder in bestimmten Kombinationen - an die "Core Partikel" und anschließende funktionelle Analyse der resultierenden Partikel sind Aussagen über die Beteiligung von Einzelproteinen bzw. Proteingruppen an bestimmten ribosomalen Funktionszentren möglich (z.B. an den Bindungsstellen für Antibiotika, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren sowie am GTPase-Zentrum und an der Peptidyltransferase).

Derartige Untersuchungen an der 30S Untereinheit ergaben, daß Dihydrostreptomycin, ein Analogon von Streptomycin, nur dann mit "30S Core Partikeln" wechselwirkt, wenn die beiden "Split Proteine" S3 und S5 an die "Core Partikel" rückgebunden sind (Schreiner und Nierhaus, 1973). S3 und S5 dürften also zumindest Teil des Streptomycin-Bindungsortes und deshalb im Ribosom möglicherweise benachbart sein.

Für das Peptidyltransferase-Zentrum der 50S Untereinheit zeigten Nierhaus und Montejo (1973) und Dietrich et al. (1974), daß Protein L11 und in geringerem Maße L16 und L6 für die Transferase-Aktivität zuständig sind. "50S Core Partikel" ohne L11 sind inaktiv, und zwar unabhängig davon, ob L16 und/oder L6 in den "Cores" vorliegen oder nicht. Dagegen stimuliert L16 in Anwesenheit von L11 die Aktivität. L6 wirkt nur zusammen mit L11 und L16 verstärkend.

Obwohl neuere Arbeiten von Noller und Mitarbeitern (Moore, V. G. et al., 1975), Ballesta und Vasquez (1974) und Howard und Gordon (1974) besagen, daß nicht L11, sondern L16 die Transferase-Aktivität bedingt, ist die gemeinsame Beteiligung von L6, L11 und L16 an dieser Funktion doch sehr wahrscheinlich. Die Untersuchung des ribosomalen Bindungsortes für Chloramphenicol (Nierhaus und Nierhaus, 1973; Dietrich et al., 1974) - ein die Peptidyltransferase hemmendes Antibiotikum <sup>\*)</sup> - ergab, daß L16 und (in geringerem Maße) L11 die Bindungsproteine sind. L6 besitzt in "Core Partikeln" ohne L11 und L16 keine Affinität für das Antibiotikum, jedoch stimuliert L6 die Chloramphenicol-Bindung an L16. L6 scheint außerdem in "Cores" mit L11 und L16 für die inhibierende Wirkung von Chloramphenicol verantwortlich zu sein. Aufgrund der gemeinsamen Wirkung von L6, L11 und L16 auf die Peptidyltransferase-Aktivität und Chloramphenicol-Bindung kamen Dietrich et al. (1974)

---

<sup>\*)</sup> Chloramphenicol verhindert die Anlagerung des 3'-Terminus von aa-tRNA in der "a-site" an das Ribosom (für Referenzen s. Nierhaus und Nierhaus, 1973).

zu dem Schluß, daß diese Proteine in der 50S Untereinheit am Peptidyltransferase-Zentrum benachbart vorliegen dürften.

50S Untereinheiten, denen durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Äthanol-Behandlung die Proteine L7/L12 selektiv abgespalten sind (Hamel et al., 1972), weisen keine fakto-renabhängige GTP-Hydrolyse auf, weil eine Anlagerung der Faktoren an das Ribosom verhindert ist. Nach Rückbinden der beiden Proteine an die "50S Cores" findet sowohl Faktorenbindung als auch GTP-Hydrolyse wieder statt. IF2 (Fakunding et al., 1973; Lockwood et al., 1974), EF-G und EF-Tu (Kischa et al., 1971; Hamel et al., 1972; Sander et al., 1972; Brot et al., 1972) sowie RF1 und RF2 (Brot et al., 1974) sollten demnach bei L7/L12 direkt ihre Bindungsstellen bzw. den überlappenden Bereich ihrer jeweiligen Bindungsorte besitzen.

### c. Inkubation von intakten Ribosomen mit ribosomalen Einzelproteinen

Funktionsanalyse von Ribosomen, die unter Rekonstitutionsbedingungen als intakte Partikel mit einem Überschuß eines Einzelproteins bzw. Proteingemisches inkubiert worden sind, erlauben weitere Aussagen über die Funktionsbeiträge bestimmter Proteine im Ribosom.

Protein S1 ist für die Bindung synthetischer und natürlicher mRNA an Ribosomen verantwortlich (van Duin und Kurland, 1970; Tal et al., 1972; van Duin und van Knippenberg, 1974; van Dieijen et al., 1975), während S21 die Anlagerung von  $\text{fMet-tRNA}_f^{\text{Met}}$  verhindert, wenn 50S Subpartikel anwesend sind (van Duin et al., 1972). Die Proteine S2, S3 und S14 sollten aufgrund folgender gemeinsamer Funktionsbeiträge im Ribosom benachbart sein: 1. Sie stimulieren die enzymatische Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosomen und dürften somit zumindest teilweise die "a-site" bilden (Randall-Hazelbauer und Kurland, 1972). 2. Sie fördern die enzymatische Anlagerung der Initiations-tRNA in die ribosomale "p-site" (van Duin et al., 1972). Aus dieser Doppelfunktion von S2, S3 und S14 wurde gefolgert, daß "a-" und "p-site" auf der 30S Untereinheit einen gemeinsamen Ort einnehmen (Kurland et al., 1972a; van Duin et al., 1972).

### 3.2. Antibiotikaresistenz und Ribosomen

Bestimmte Antibiotika inhibieren bei der Translation ribosomale Teilfunktionen durch Wechselwirkung mit dem Ribosom (für Übersichtsarbeiten s. Pestka, 1971a, b; Benveniste und Davis, 1973; Vasquez, 1974). Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von veränderten Ribosomen aus



Bakterienmutanten, die gegen solch ein Antibiotikum resistent sind, erlaubt Aussagen über die Wirkungsweise des Antibiotikums und seine Wirkungsstelle am Ribosom und gibt somit Hinweise auf die ribosomale Topographie: Es kann davon ausgegangen werden, daß ein verändertes Genprodukt im Mutantenribosom jenem unveränderten Gegenstück im Wildtypribosom entspricht, das in den durch das Antibiotikum gehemmten Funktionsschritt eingreift. Diese Komponente ist als Bestandteil des Wirkungsortes anzusehen. Gleichzeitig könnte sie der Bindungsstelle für das Antibiotikum bzw. deren unmittelbarer Umgebung angehören, wenn man annimmt, daß beide Stellen zumindest eng benachbart, teilweise überlappend oder sogar identisch sind.

Dasselbe sollte auch für veränderte Ribosomen aus antibiotikaabhängigen und -unabhängigen Mutanten zutreffen.

An einem allgemeinen Beispiel für antibiotikaresistente Mutanten sind im Folgenden die Versuchstechniken aufgeführt, mit deren Hilfe sich die ribosomalen Komponenten an der Wirkungsstelle für ein Antibiotikum bestimmen lassen:

Um festzustellen, welche der beiden ribosomalen Untereinheiten ein verändertes Genprodukt enthält, werden in vitro sogenannte "Hybridribosomen" gebildet, die sich entweder aus Wildtyp-30S und Mutanten-50S Untereinheiten oder aus Mutanten-30S und Wildtyp-50S zusammensetzen. In Gegenwart des Antibiotikums werden diese Ribosomen im Vergleich zu normalen Wildtyp- und Mutantenribosomen auf ihre funktionelle Aktivität untersucht. Die veränderte Komponente ist dabei derjenigen Mutantenuntereinheit zuzuordnen, welche die Resistenz der "Hybridribosomen" gegen das Antibiotikum bedingt. Mit Hilfe der totalen Rekonstitution von ribosomalen Untereinheiten aus isolierten Proteinen und reiner rRNS (s. den vorhergehenden Abschnitt 3.1.) läßt sich bestimmen, ob der Proteinanteil oder die RNS durch die Mutation verändert ist. Dazu werden Untereinheiten mit den Proteinen der Mutantenribosomen und der rRNS der Wildtypribosomen (oder umgekehrt) rekonstituiert. Verleiht der Proteinanteil der Mutantenribosomen den rekonstituierten Untereinheiten die mutantenspezifische Funktion, werden zur Identifizierung des veränderten Proteins in der Regel mehrere Methoden angewendet:

- a. Die Proteine der Mutantenribosomen werden im Vergleich zu ribosomalen Wildtypproteinen säulenchromatographisch und gelelektrophoretisch auf abweichendes Trennungsverhalten untersucht.
- b. Mit Hilfe von Antiseren gegen ribosomale Einzelproteine des Wildtyps werden mögliche veränderte antigene Eigenschaften der Mutantenproteine ermittelt.
- c. Durch proteinchemische Analysen werden Veränderungen in der Aminosäurekomposition und -sequenz der

Mutantenproteine bestimmt. d. Mittels totaler oder partieller Rekonstitution werden Untereinheiten gebildet, deren Proteinanteil aus jeweils einem Mutantenprotein und im übrigen aus Wildtypproteinen besteht. In Funktionstesten ist der funktionelle Beitrag des Mutantenproteins zu überprüfen.

Die am ausführlichsten charakterisierten ribosomalen Mutanten sind die mit verändertem Verhalten gegen Streptomycin; sie sollen daher als spezielles Beispiel vorgestellt werden. Dieses Antibiotikum ruft vielfältige Effekte hervor. Es bewirkt Fehleinbau von Aminosäuren ("Misreading") bei der Translation in intakten Bakterien (Gorini et al., 1961) und in In-vitro-Systemen (Davies et al., 1964). In Gegenwart von Streptomycin wird ferner ein instabiler Initiationskomplex geformt (Modolell und Davis, 1970), die Anlagerung der Aminoacyl-tRNS in die "a-site" verhindert (Luzzatto et al., 1969) und bei der Termination die Wechselwirkung mit RF1 und RF2 blockiert (Scolnick et al., 1968).

Sowohl die Mutation von Streptomycinsensitivität (Str-S) zu Streptomycinresistenz (Str-R) als auch die von Sensitivität zu Streptomycinabhängigkeit (-dependence = Str-D) hat eine Veränderung in Protein S12 der 30S Untereinheit zur Folge (Birge und Kurland, 1969; Nomura et al., 1969; Ozaki et al., 1969; Funatsu und Wittmann, 1972; Funatsu et al., 1972a). Viele "Revertanten" von Str-D zu Str-I (Streptomycin independence oder -unabhängigkeit) (Hashimoto, 1960), weisen keine Rückmutation in S12 auf, vielmehr ist zusätzlich Protein S4 oder S5 verändert (Birge und Kurland, 1970; Deusser et al., 1970; Kreider und Brownstein, 1971, 1972; Stöffler et al., 1971c; Donner und Kurland, 1972; Funatsu et al., 1972c; Hasenbank et al., 1973; Itoh und Wittmann, 1973). Die ram-(ribosomal ambiguity-<sup>+)</sup>) Mutation, die zu entsprechendem "Misreading-Effekt" wie Streptomycingabe führt, beruht ebenfalls auf einer Veränderung in S4 und dürfte mit der oben erwähnten S4-Mutation identisch sein (Bjare und Gorini, 1971; Zimmermann et al., 1971; Hasenbank et al., 1973; van Acken, 1975; zur Übersicht s. Gorini, 1974).

Der Streptomycin-Wirkungsort, der - wie zuvor ausgeführt - in Annäherung der Bindungsstelle entsprechen sollte, wird nach diesen Befunden durch die Proteine S12, S4 und S5 direkt beeinflusst. Es kann daher angenommen werden, daß diese drei Proteine im Ribosom benachbart vorliegen. Da die Mehrzahl der Untersuchungen über die Wirkungsweise von Streptomycin am Ribosom zeigt, daß

---

<sup>+) = ribosomale Uneindeutigkeit bei der Translation; Translation eines Codons in mehrere Aminosäuren</sup>

es die Interaktion zwischen Ribosom und tRNS beeinflusst, ist eine Beteiligung dieser Proteine an der ribosomalen tRNS-Bindungsstelle wahrscheinlich.

### 3.3. Chemische Modifikation von ribosomalen Proteinen

Ribosomen, deren Proteinanteil mit aminosäurespezifischen Reagenzien selektiv modifiziert ist, werden im Vergleich zu unbehandelten Ribosomen auf ihre funktionelle Aktivität untersucht. Die Veränderungen bestimmter ribosomaler Teilfunktionen werden dabei den chemisch veränderten Proteinen zugeschrieben. Zwei Arten von Modifikationsexperimenten werden durchgeführt:

a. Ribosomale Untereinheiten werden direkt mit einem modifizierenden Reagens behandelt. Anschließend müssen diejenigen Proteine identifiziert werden, die für funktionelle Inaktivierungen verantwortlich sind. Da im allgemeinen mehrere Proteine modifiziert sind, aber in der Regel nur einige einen inhibitorischen Effekt ausüben, sind häufig aufwendige Charakterisierungsschritte zur Bestimmung der "funktionellen" Proteine notwendig.

Modifikation von Protein S1 mit dem Farbstoff Rose Bengal inhibiert die Bindung von Polyuridylsäure (Poly-U) und Phenylalanyl-tRNS (Phe-tRNS) an 30S Untereinheiten (Noller et al., 1971). S1 sollte demnach an der Bindung von Poly-U und Phe-tRNS direkt beteiligt sein. Reaktion von S1, S14 und S21 mit N-Äthylmaleinimid behindert die Anlagerung von Aminoacyl-tRNS an die 30S Untereinheit (Ginzburg et al., 1973). Dieses Ergebnis deutet auf eine benachbarte Anordnung der drei Proteine an der Bindungsstelle für Aminoacyl-tRNS, d.h. an der ribosomalen "a-site".

b. Statt ribosomaler Untereinheiten werden jeweils reine ribosomale Einzelproteine chemisch modifiziert und zusammen mit den übrigen unbehandelten Proteinen unter Rekonstitutionsbedingungen in Untereinheiten gebunden. Unter der Voraussetzung, daß in Gegenwart eines chemisch behandelten Proteins alle Proteine in die Untereinheiten eingebaut werden, lassen Untersuchungen solcher Subpartikel unmittelbare Aussagen über den Funktionsbeitrag eines bestimmten Proteins im Ribosom zu.

Bislang haben Studien mit diesem vielversprechenden Versuchsaufbau keine weiterführenden Ergebnisse erbracht. Mit Äthylenimin modifizierte Einzelproteine der 30S Untereinheit wurden entweder bei der Rekonstitution nicht eingebaut oder bewirkten als Bestandteile des Ribosoms keine nachweisbaren Funktionsänderungen (Kahan et al., 1974).

### 3.4. Affinitätsmarkierung von Ribosomen

Komponenten, die mit dem Ribosom wechselwirken (z.B. tRNS, mRNS, Antibiotika), werden chemisch derart modifiziert, daß sie - von sich aus oder durch Aktivierung - bei der Anlagerung an das Ribosom mit ribosomalen Proteinen eine kovalente Bindung eingehen. Unter der Voraussetzung, daß die natürlichen Komponenten und deren chemisch reaktive Analoga gleiche Bindungseigenschaften haben, kann geschlossen werden, daß affinitätsmarkierte Proteine an den Bindungsstellen für die natürlichen Komponenten liegen (s. Cantor et al., 1974b).

Für beladene tRNS, deren Aminosäurerest reaktiv ist, konnten folgende Bindungsproteine ermittelt werden: In der ribosomalen "p-site" gebundene Initiations-tRNS reagiert mit dem SOS-Protein L27 (Hauptmann et al., 1974). Je nach chemisch reaktiver Gruppe im Aminosäurerest markiert Peptidyl-tRNS hauptsächlich die Proteine L2 und L27 (Oen et al., 1973; Pellegrini et al., 1974), L2, L15 und L27 (Czernilofsky et al., 1974a, b) oder L11 und L18 (Hsiung et al., 1974). Aminoacyl-tRNS in der "a-site" reagiert ebenfalls mit L2 und L27 und zusätzlich mit L16 (Eilat et al., 1974a). Aufgrund der teilweise überlappenden Bindungsbereiche für Aminoacyl- und Peptidyl-tRNS sollten die Proteine L2, L11, L15, L16, L18 und L27 in der Region der ribosomalen "a-" und "p-site" benachbart vorkommen.

Zum Teil übereinstimmende Proteinnachbarschaften in dieser Region wurden durch Bindungsstudien mit chemisch reaktiven Analoga von Puromycin und Chloramphenicol erbracht, zwei Antibiotika also, deren Wirkungsstelle in der Nähe der ribosomalen "a-site" liegen <sup>\*)</sup>. Bindungsproteine für Puromycin sind L6 und L2 (Pongs et al., 1973b; Pongs und Erdmann, in Vorbereitung), für Chloramphenicol L2 und L27 (Sonnenberg et al., 1973) und L16 (Pongs et al., 1973a).

In entsprechenden Versuchen wurde eine Proteingruppe der 30S Untereinheit am mRNS-Bindungsstelle ermittelt. Reaktives Initiationscodon AUG markiert die Proteine S1, S4, S11, S12, S13, S18 und S21 (Pongs und Lanka, 1975a, b; zur Übersicht s. Bald et al., 1975).

### 3.5. Immunologische Untersuchungen

Jedes ribosomale Protein ist an der Oberfläche intakter Ribosomen für Antikörper gegen hochgereinigte ribosomale Einzelproteine erreichbar

---

<sup>\*)</sup> s. Fußnoten S.13 und S.20 .



(s. Ergebnisteil I. der vorliegenden Arbeit). Diese Tatsache ist für immunologische Untersuchungen von ribosomalen Teilfunktionen ausgenutzt worden. Ribosomen werden mit einzelproteinspezifischen Antikörpern inkubiert und anschließend im Vergleich zu unbehandelten auf ihre verbleibende Fähigkeit zur Anlagerung einer Komponente untersucht, die während des ribosomalen Funktionszyklus an das Ribosom bindet. Reduzierte oder total verhinderte Anlagerung läßt auf eine Blockierung des Bindungsortes für die Komponente oder dessen unmittelbarer Umgebung durch vorgebundene Antikörper schließen (s. Stöffler, 1974).

Auf diese Weise konnte unter anderem gezeigt werden, daß L7/L12 die Bindungsproteine für die Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu (Kischa et al., 1971; Highland et al., 1973, 1974a, b) und die Terminationsfaktoren RF1 und RF2 (Tate et al., 1975) sind. Durch Inkubation von Ribosomen mit Antikörpern gegen L7/L12 wird die Anlagerung der Faktoren an das Ribosom blockiert und dadurch die jeweilige faktorenabhängige GTP-Hydrolyse gehemmt.

Für die Anlagerung von tRNS sind auf der 30S Untereinheit mehrere Proteine zuständig. Antikörper gegen 11 Proteine (S1, S3, S8, S9, S10, S11, S14, S18, S19, S20 und S21) inhibieren die EF-Tu-abhängige Bindung von Phe-tRNS, während Antikörper gegen 12 Proteine (S1, S2, S3, S5, S6, S10, S12, S13, S14, S19, S20 und S21) die IF2-abhängige Anlagerung von Initiations-tRNS behindern (Maschler, 1973; Lelong et al., 1974). Nach diesen Ergebnissen sind die ribosomalen "a-" und "p-sites" auf der 30S Untereinheit in ihren Proteinkompositionen sehr komplex und zum Teil überlappend.

Die Beispiele in den vorigen Abschnitten haben gezeigt, daß die Zuordnung ribosomaler Teilfunktionen zu bestimmten Proteinen im intakten Ribosom Aussagen über die funktionelle Organisation der ribosomalen Proteine in situ erlaubt. Die gemeinsame Beteiligung mehrerer Proteine an ein und demselben Funktionsschritt deutet dabei auf Proteinnachbarschaften im Partikel. Der Schluß, daß diese funktionellen Ergebnisse generell die physikalische Proteinorganisation an den Funktionszentren wiedergeben, wäre zu weit gegriffen: Insbesondere die Resultate der Rekonstitutionsversuche, der genetischen Untersuchungen und einiger chemischer Modifikationsexperimente könnten dadurch eingeschränkt sein, daß der Funktionsbeitrag eines Proteins auf Fernwirkungen im Ribosom anstatt auf unmittelbarer Beteiligung am Funktionsort beruht. Es bedarf folglich struktureller Untersuchungen, um die physikalische Anordnung der Proteine im Ribosom aufzuklären.

Die vorliegende Arbeit liefert dazu mit ihren Ergebnissen immunologischer Untersuchungen zur Ribosomentopographie einen Beitrag.

#### 4. Thematik der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe immunologischer Methoden Erkenntnisse über die strukturelle Organisation der Proteine an der Ribosomenoberfläche zu gewinnen, um somit Einblick in den dreidimensionalen Aufbau des Ribosoms zu bekommen. Antikörperpräparationen gegen hochgereinigte ribosomale Einzelproteine erlaubten, folgende Versuche durchzuführen:

1. Es wurde untersucht, ob die gegen isolierte ribosomale Einzelproteine gerichteten Antikörper an intakte undissoziierte 70S Ribosomen und deren isolierte Untereinheiten binden. Reaktion zwischen einzelproteinspezifischen Antikörpern und Ribosomen ließ auf Zugänglichkeit der entsprechenden Proteine an der Ribosomenoberfläche schließen.
2. Durch Einwirkung bifunktioneller Reagenzien auf Ribosomen wurden einige ribosomale Proteine miteinander kovalent vernetzt. Die Proteinkomplexe wurden aus den Ribosomen isoliert und immunologisch identifiziert. Die Vernetzbarkeit zweier Proteine ließ den Schluß zu, daß diese beiden Proteine im Ribosom benachbart vorliegen.
3. Antikörper gegen ribosomale Einzelproteine wurden an ribosomale Untereinheiten gebunden und die Antikörperbindungsstellen elektronenoptisch sichtbar gemacht. Aufgrund der Strukturiertheit der Untereinheiten konnten diese Antikörperbindungsstellen, welche die Orte der jeweiligen antigenen Proteine an der Ribosomenoberfläche repräsentieren, bestimmten ribosomalen Strukturmerkmalen zugeordnet werden. Diese immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen ermöglichten, dreidimensionale Modelle der beiden Ribosomen-Untereinheiten aufzustellen.

Die gemeinsame Diskussion der Resultate aller drei Versuchsteile erlaubte unter Berücksichtigung von Literaturdaten Aussagen über

Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter 70S Ribosomen, verschiedene Konformationen zwischen ribosomalen Untereinheiten in undissoziiertem Zustand (d.h. in 70S Ribosomen) und Untereinheiten in dissoziiertem Zustand (d.h. in isolierten Subpartikeln), die Gestalt einiger Proteine im Ribosom und

## Proteinnachbarschaft und -verteilung im Ribosom

sowie vorläufige Zuordnungen ribosomaler Funktionszentren zu Strukturmerkmalen der Ribosomenoberfläche.

### 5. Einige immunologische Grundlagen<sup>\*)</sup>

Der  $\gamma$ -Globulin-Anteil von Antiseren enthält Immunglobuline verschiedener Klassen (IgG, IgM, IgA, in geringen Mengen auch IgD und IgE). IgG-Antikörper, die für die Versuche dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurden, machen in normalen Antiseren ca. 70% aller  $\gamma$ -Globuline aus. Davon sind 1-3% in Antiseren aus Tieren, die über einen längeren Zeitraum mit demselben Immunogen wiederholt immunisiert werden, - sogenannten Hyperimmunseren - gegen das spezifische Antigen gerichtet.

#### Antikörper-Struktur

Die Struktur eines IgG-Antikörpers, der eine Sedimentationskonstante von 7S und ein Molekulargewicht von ca. 150000 Dalton hat, ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Ein IgG baut sich in symmetrischer Anordnung aus je zwei identischen leichten (light) und schweren (heavy) Ketten auf, von denen die letzteren einen Kohlenhydratanteil aufweisen. Durch intermolekulare Disulfidbrücken (Cystine) stehen jeweils eine leichte mit einer schweren Kette sowie die schweren Ketten untereinander in Verbindung. Die vier Teilmoleküle werden weiterhin durch Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Bindungen zusammengehalten.

Jede der vier Ketten besitzt Aminosäuresequenzen, die sich in konstante und variable Abschnitte gliedern lassen. Die variablen Regionen am N-Terminus jeweils einer leichten und einer schweren Kette bilden den spezifischen antigenbindenden Bereich. Ein IgG-Molekül hat aufgrund seiner Symmetrie zwei identische Antigenbindungsbereiche und somit zwei Valenzen.

Durch proteolytische Verdauung mit dem Enzym Papain ist ein IgG in drei Fragmente zu spalten: in zwei N-terminale identische Teile, die jeweils einen Antigenbindungsbereich enthalten (2 Fabs = Fragments antigen binding) und einen C-terminalen Abschnitt, der Fc (= Fragment cristallizable) genannt wird.

---

<sup>\*)</sup> Ausführliche Zusammenfassungen immunologischer Grundlagen geben Eisen (1973), Humphrey und White (1972), Kabat (1971) und Sela (1969, 1973, 1974).

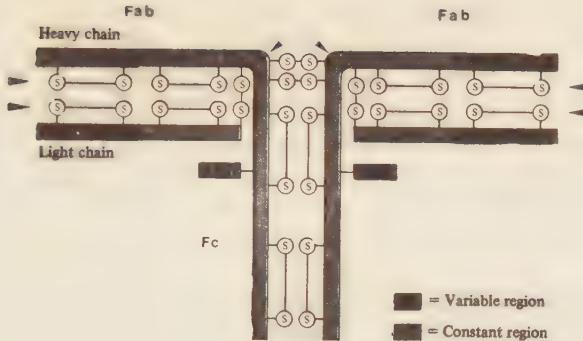


Abb. 1. Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers  
(aus Watson, 1970, S.565)

↓ Spaltungsort von Papain  
 Fab Fragment antigen binding  
 Fc Fragment Crystallizable  
 CHO Kohlenhydratanteil  
 -S-S- Disulfidbrücken  
 ↓ ↓ Antigenbindungs-bereich

Für weitere Einzelheiten siehe Text.

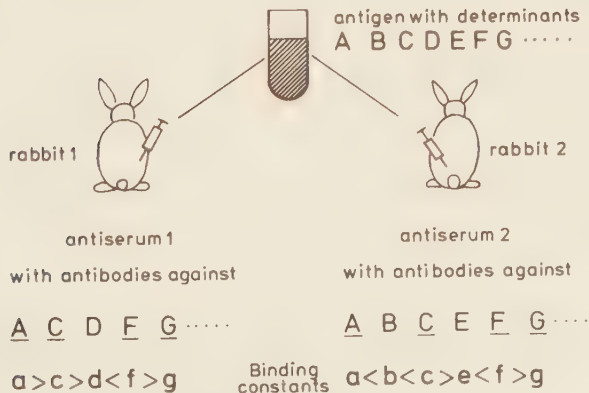


Abb. 2. Individuelle Immunantworten verschiedener Tiere  
Einzelheiten werden im Text erklärt.



Isolierte Fabs behalten ihre Kapazität zur Antigenbindung, besitzen wegen ihrer Monovalenz jedoch keinen vernetzenden Charakter.

Das T- bis Y-förmige IgG-Molekül hat folgende Maße ( Davies et al., 1971; Sarma et al., 1971): Der Querbalken hat Dimensionen von ca.  $140\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 40\text{\AA}$ , der aufrechte Balken  $60\text{-}70\text{\AA} \times 45\text{\AA} \times 38\text{\AA}$ . Ein Fab sollte demnach Dimensionen von  $70\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 40\text{\AA}$  haben. In guter Übereinstimmung damit sind Befunde über isolierte Fabs ( $80\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 40\text{\AA}$ ) (Poljak et al., 1973).

Die Antikörper der anderen beiden Hauptklassen (IgM und IgA) weisen abweichende Strukturen auf. Alle Antikörper bestehen zwar aus leichten und schweren Polypeptidketten, jedoch variieren die schweren Ketten je nach Klasse in ihrem Kohlenhydratanteil und Molekulargewicht. IgM-Antikörper setzen sich aus fünf kovalent verbundenen 7S-Grundmolekülen von ähnlichem Aufbau wie IgGs zusammen. Das Pentamer (900000 Dalton, 19S) besitzt nicht, wie erwartet, zehn Valenzen, sondern lediglich fünf. IgA-Antikörper sind bivalente 7S-Moleküle (150000 Dalton), die dazu neigen, untereinander Komplexe mit höheren Sedimentationswerten zu bilden.

### Immunogen und Antigen

Immunogene sind Substanzen, die in höheren Vertebraten die Bildung spezifischer Antikörper hervorrufen. Als Antigene werden Substanzen bezeichnet, die mit vorbestehenden Antikörpern spezifisch reagieren. Polymere wie Proteine, Polypeptide, einige Polysaccharide und Nukleinsäuren können als Immunogene und Antigene wirken. Makromoleküle mit diesen Eigenschaften werden deshalb in der Literatur häufig auch einheitlich nur Antigene genannt. Eine Unterscheidung ist jedoch für sehr kleine Substanzen nötig, die zwar antigen sein können, aber nicht immunogen sind. Diese sogenannten Haptene führen nicht allein, sondern nur nach kovalenter Kopplung an "Träger"-Proteine zu Antikörperbildung.

Sowohl gegen die Sequenzen von Polymeren als auch deren Konformationen können Antikörper gerichtet sein (zur Übersicht s. Kabat, 1966; Sela, 1966, 1969, 1973; Sela et al., 1967; Arnon, 1971; Benjamini et al., 1972). Versuche mit synthetischen Oligosacchariden und -peptiden ergaben, daß Molekülketten, die aus mindestens 3-6 Glukoseresten oder 4-6 Aminosäureresten bestehen ( $27\text{-}36\text{\AA} \times 10\text{-}17\text{\AA} \times 6\text{-}7\text{\AA}$ ), zur Bildung von Immunglobulinen führen und optimal mit homologen Antikörpern kombiniert werden können (s. zur Übersicht

z.B. Kabat, 1966; Sela, 1969). Aus der Größe der Oligomere wurde gefolgert, daß eine immunogene/antigene Determinante bzw. die Antigenbindungsgebiete der Antikörper entsprechende Maße haben. Kristallographische Untersuchungen von Fab-Molekülen zeigten, daß die Antigenbindungsgebiete der Antikörper kleiner sein können. Je nach Hapten liegen die Dimensionen zwischen  $15\text{\AA} \times 6\text{\AA} \times 6\text{\AA}$  und  $20\text{\AA} \times 15\text{\AA} \times 12\text{\AA}$  (Amzel et al., 1974; Segal et al., 1974).

### Variabilität der Immunantwort

a. Variabilität der Immunantwort eines Individuums: Nach Injektion eines Immunogens treten die Antikörper der einzelnen Immunglobulinklassen bei der primären Immunantwort zu verschiedenen Zeiten auf. Zuerst werden IgM-Antikörper, dann IgGs gebildet. Im Gegensatz zu den IgGs geht der Anteil an IgMs im Serum kurz nach der Immunisierung wieder zurück.

Die Antikörper einer Klasse können im Laufe der Immunisierung veränderte Avidität<sup>\*)</sup> aufweisen. Die Variabilität der Antikörperbindungskonstanten<sup>++)</sup> ist dafür verantwortlich.

b. Variabilität der Immunantwort verschiedener Individuen: Ein und dasselbe Immunogen kann in verschiedenen Individuen unterschiedliche Immunantworten hervorrufen. Das gilt sowohl für Tiere verschiedener Spezies als auch für mischrassige Tiere derselben Art. Für Tiere aus Inzuchtstämmen, d.h. genetisch nahezu gleichartige Individuen, sind dagegen einheitlichere Immunantworten nachgewiesen.

Ein Beispiel für die Variabilität der Immunantwort gibt Abbildung 2. Mischrassigen Kaninchen wird eine Substanz mit den Determinanten A, B, C, D, E, F, G, ... injiziert, wobei infolge von Antigenkonkurrenz<sup>+++)</sup> in jedem Tier nur gegen eine Auswahl aller potentiellen Determinanten Antikörper gebildet werden. Die gewonnenen Antiseren können dabei je nach Tierursprung Antikörperpopulationen mit verschiedenen Titern, voneinander abweichenden Bindungskonstanten und nur teilweise überlappenden Determinantenspezifitäten enthalten.

---

\*) Avidität = Fähigkeit von Antikörpern, ein Antigen zu binden und stabile Antigen-Antikörper-Komplexe zu bilden.

++) Für Bindungskonstanten diverser Antikörperpräparationen wurden Werte zwischen  $4 \times 10^3$  und  $1 \times 10^9$  l/Mol bestimmt.

+++) Antigenkonkurrenz = die Immunantwort auf ein/eine Immunogen/immunogene Determinante wird durch die Gegenwart eines/einer anderen unterdrückt.

## C. Materialien und Methoden

### 1. Verwendete Puffer

#### TSM-Puffer

0,01 M Tris, pH 8,0  
 0,003 M Bernsteinsäure  
 0,01 M  $\text{MgCl}_2$

#### TMA I-Puffer

0,01 M Tris-HCl, pH 7,6  
 0,01 M  $\text{MgCl}_2$   
 0,03 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 0,006 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol

#### TMA II-Puffer

0,01 M Tris-HCl, pH 7,6  
 0,003 M  $\text{MgCl}_2$   
 0,03 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 0,006 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol

#### Tris-Waschpuffer

0,02 M Tris-HCl, pH 7,8  
 0,002 M  $\text{MgCl}_2$   
 0,5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 0,01 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol

#### Hepes-Waschpuffer

0,05 M Hepes-NaOH, pH 7,8  
 0,02 M  $\text{MgCl}_2$   
 0,5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 0,01 M Dithiothreitol (DTT)

#### Hepes-Inkubationspuffer

0,05 M Hepes-NaOH, pH 7,8  
 0,02 M  $\text{MgCl}_2$   
 0,1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$

#### Ouchterlony-Puffer I

0,02 M Na-Veronal, pH 8,6  
 0,75 M LiCl  
 0,02% Cialit

## Ouchterlony-Puffer II

0,1 M Tris-HCl, pH 8,2

1,0 M LiCl

0,02% Na-Azid

## TEAMK-Puffer

0,01 M Triäthanolamin-HCl, pH 8,5

0,005 M  $\text{MgCl}_2$ 

0,02 M KCl

0,006 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol

## PMK I-Puffer

0,005 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,60,02 M  $\text{MgCl}_2$ 

1,0 M KCl

0,006 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol

## PMK III-Puffer

0,005 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,60,002 M  $\text{MgCl}_2$ 

0,25 M KCl

0,006 M  $\beta$ -Mercaptoäthanol

## Säulen-Puffer I

0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,8

0,012 M Methylamin

6,0 M Harnstoff

## Säulen-Puffer II

0,05 M Tris-HCl, pH 8,2

0,5 M LiCl

Alle Puffer wurden bei 4°C eingestellt.

## 2. Zellen

Für die Zugänglichkeitsstudien (Teil D.I.) und elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Teil D.III.) wurden Ribosomen aus *Escherichia coli*, Stamm K12 (A19) (Gesteland, 1966) verwendet. Die Zellen wurden in reichem Medium (Hefe-Extrakt und Pepton, beides von Difco Labs, Detroit, Michigan, USA) bis zur mittleren log-Phase gezogen. Zur Gewinnung radioaktiver Ribosomen wurden Zellen desselben Stamms in einem modifizierten M9-Medium (Birge und Kurland, 1970) ebenfalls bis zur mittleren log-Phase gezogen.

1mC  $^3\text{H}$ -L-Aminosäuregemisch (NET 250, NEN, New England Nuclear) wurde dabei zu einer 200 ml-Kultur gegeben.

Ribosomen aus den E. coli-Stämmen B236 und PL1 wurden für die Vernetzungsexperimente (Teil D.II.) verwendet. Die Zellen wurden in minimalem Medium, das mit Kasein-Aminosäuren angereichert war (Kjelgaard und Kurland, 1963), bis zur späten log-Phase gezogen (Kurland, 1966).

Mittels Zentrifugation wurden die Zellen geerntet, mit einem der Puffer, die zur Ribosomenpräparation verwendet wurden, gewaschen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert,

### 3. Präparation von Ribosomen

30S und 50S Untereinheiten: Im allgemeinen wurden in TMA I-Puffer suspendierte Zellen durch Zermahlen mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Alcoa A-305) aufgebrochen.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und Zellwandfragmente wurden durch dreimalige Zentrifugation in einem SS 34-Rotor (Sorvall) (30 Minuten, 16000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) sedimentiert und der Überstand mit den Ribosomen 4,5 Stunden bei 55000 Upm ( $4^{\circ}\text{C}$ ) mit einem 60 Ti-Rotor in einer Spinco-Ultrazentrifuge (Beckman) zentrifugiert. Die Ribosomen im Sediment wurden in Tris-Waschpuffer aufgeschwemmt und abermals durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Zum Auftrennen der Untereinheiten wurden die Ribosomen zunächst durch Dialyse gegen TMA II-Puffer in ihre Untereinheiten dissoziiert und anschließend einer Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation in einem Spinco B XV-Ti-Zonalrotor (Beckman) unterzogen (17 Stunden, 25000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$ ; Rohrzuckergradient: 7,5-38%, w/w, in TMA II-Puffer). Um gegenseitige Kontaminationen der Untereinheiten so gering wie möglich zu halten, wurden 30S Untereinheiten einmal, 50S Untereinheiten zweimal mittels Zonalzentrifugation nachgereinigt. Derart gewonnene Untereinheiten wurden in einem 60 Ti-Rotor abzentrifugiert (17 Stunden, 55000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und in TMA I-Puffer unter flüssigem Stickstoff gelagert. Die Aufarbeitungsprozedur ist von Hindennach et al. (1971a) detailliert beschrieben.

Zur Gewinnung von 30S Untereinheiten für die Vernetzungsversuche (Teil D.II.) wurden die Bakterien in TSM-Puffer suspendiert und in einer "French Press" aufgebrochen. Mit Hilfe mehrerer Fraktionierungen mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  einschließlich verschiedener differentieller Zentrifugationsschritte wurden die Ribosomen gereinigt und über Rohrzucker-Dichtegradienten in ihre Untereinheiten aufgetrennt. Die Aufarbeitungsmethoden sind ausführlich von Kurland (1966) und Hardy et al. (1969) beschrieben.



Undissoziierte 70S Ribosomen: Mit Hilfe des Enzyms Lysozym wurden die Zellen aufgebrochen (Ron et al., 1966). 100 g Zellen wurden 15 Minuten bei 0°C in 60 ml TSM-Puffer inkubiert, in dem 70 mg Lysozym (Boehringer, Mannheim) und 1 mg Desoxyribonuklease 1 (RNase-frei) (Worthington, New Jersey, USA) gelöst waren. Das Gemisch wurde bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen und entsprechender Inkubation, wie oben beschrieben, wurden die Zellen wieder eingefroren. Nach abermaligem Auftauen wurden die aufgebrochenen Zellen dreimal je 30 Minuten bei 16000 Upm in einem SS 34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Zentrifugation in einem 60 Ti-Rotor unterzogen (4 Stunden, 40000 Upm, 4°C) und das Sediment mit den Ribosomen anschließend in Hepes-Waschpuffer gelöst. Teilmengen von 250 OD<sub>260</sub>/ml wurden auf Rohrzucker-Dichtegradienten geschichtet (10-30%, w/w, in Hepes-Inkubationspuffer) und mit einem SW 27-Rotor in einer Spinco-Ultrazentrifuge 11 Stunden bei 23000 Upm (4°C) zentrifugiert. Fraktionen mit 70S Ribosomen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und ebenda gelagert.

<sup>3</sup>H-markierte 70S Ribosomen: Radioaktiv markierte Ribosomen wurden durch Zermahlen der Zellen mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gewonnen (s. S. 34). Die Ribosomen hatten eine spezifische Aktivität von  $0,3 \times 10^6$  cpm/1 OD<sub>260</sub>.

Mit Ausnahme der radioaktiv markierten Ribosomen wurden alle verwendeten Ribosomen im Poly-U-(Polyuridylsäure-)abhängigen Poly-Phe-(Polyphenylalanin-)Synthesystem auf ihre Aktivität untersucht (Nirenberg und Matthaei, 1961). Nur aktive Ribosomen wurden für die weiteren Versuche benutzt.

#### 4. Präparation von 30S Untereinheiten mit radioaktiv markiertem Protein S5 oder S8

##### a. Präparation der Proteingemische

Zur Herstellung von Proteingemischen, die jeweils <sup>3</sup>H-markiertes Protein S5 oder S8 an Stelle des entsprechenden unmarkierten Proteins enthielten, wurden zunächst sog. "Proteinmixe" präpariert, denen je eins der beiden Proteine fehlte ("Mix -S5" und "Mix -S8"). Dazu wurden die 30S-ribosomalen Proteine nach Essigsäure-Extraktion säulenchromatographisch über Cellulosephosphat-Ionenaustauscherharz in Säulenpuffer-I aufgetrennt, mit einem Gradienten von 0-0,6 M NaCl eluiert (Hardy et al., 1969) und konstante Volumina von jeder Trennungsfraction vereinigt, wobei die Fraktionen mit S5 bzw. S8 ausgelassen wurden. In einigen Fällen war es nötig, diese Fraktionen über

Sephadex G-100 nachzureinigen; Fraktionen mit anderen Proteinen als S5 bzw. S8 wurden dann zu den entsprechenden "Mischen" gegeben.

Die Präparationen "Mix -S5" und "Mix -S8" wurden mit  $^3\text{H}$ -Lysin-markiertem Protein S5 bzw. S8 versetzt und zur Rekonstitution von 30S Untereinheiten mit einem markierten Protein verwendet. Die radioaktiv markierten Proteine wurden freundlicherweise von Professor Kurland zur Verfügung gestellt.

## b. Rekonstitution von 30S Untereinheiten

Die Rekonstitutionsmethode nach Traub und Nomura (1968) wurde mit einigen Veränderungen angewendet. Nach Kurland (1960) präparierte 16S RNS ( $10 \text{ OD}_{260}$ ) wurde in 18,89 ml PMK III-Puffer für 5 Minuten bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert. Dazu wurden in 2,91 ml PMK I-Puffer 2,4 mg 30S-Protein - bestehend aus "Mix -S5" +  $^3\text{H}$ -S5 bzw. "Mix -S8" +  $^3\text{H}$ -S8 - gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt und schließlich 2,5 Stunden bei 65000 Upm in einem Spinco 65 Ti-Rotor zentrifugiert. Die 30S Ribosomen wurden in TSM-Puffer resuspendiert und nach nochmaliger Ultrazentrifugation in TEAMK-Puffer gelöst. Die Ribosomenkonzentration wurde dabei auf  $200 \text{ OD}_{260}/\text{ml}$  eingestellt. Die rekonstituierten 30S Untereinheiten wurden standardmäßig auf ihre Aktivität im Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Synthesystem untersucht (Nirenberg und Matthaei, 1961).

## 5. Vernetzung ribosomaler Proteine *in situ* durch bifunktionelle Reagenzien

### 5.1. Reaktion von 30S Untereinheiten mit PDM

Das bifunktionelle Reagens N,N'-p-Phenylldimaleinimid (PDM) (MG 268,23) und das monofunktionelle N-Phenylmaleinimid (PM) (MG 173,17) (beide von Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin, USA) reagieren spezifisch mit Sulfhydrylgruppen (Wold, 1967). Aufgrund ihrer Unlöslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln wurden die Reagenzien in Dimethylformamid gelöst. Inkubation von Ribosomen in 10% Dimethylformamid bewirkt keinen Aktivitätsverlust bei der Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Synthese im Vergleich zu standardmäßig behandelten Ribosomen.

Eine Inkubation von 30S Untereinheiten mit den Reagenzien wurde wie folgt durchgeführt: Untereinheiten ( $200 \text{ OD}_{260}/\text{ml}$ ) in TSM-Puffer wurden mit 1/10 Volumen von jeweils frisch angesetzten Ausgangslösungen der Reagenzien versetzt (15 mg PDM/ml bzw. 19,3 mg PM/ml); das entspricht einem 625-fachen

molaren Überschuß von Maleinimidgruppen über 30S Untereinheiten. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoäthanol (1% Endkonzentration) beendet; dadurch wurde ein 14-facher Überschuß von  $\beta$ -Mercaptoäthanol über die Maleinimidgruppen erreicht. Nach Inkubation für weitere 5 Minuten bei 37°C verschwand die zitronengelbe Farbe des PDM. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt.

Mittels Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation wurde gezeigt, daß sich bei der Reaktion keine unerwünschten interribosomalen Vernetzungen ausgebildet hatten, die zu 30S-Aggregaten führten.

Die Proteine der mit PM- oder PDM-behandelten 30S Untereinheiten wurden standardmäßig durch Essigsäurebehandlung extrahiert (Hardy et al., 1969). Das Gesamtproteingemisch wurde sowohl für analytische Zwecke als auch zur weiteren Isolierung eines PDM-vernetzten Protein-Komplexes verwendet. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte säulenchromatographisch über Cellulosephosphat-Ionenaustauscher (s. 4.a. auf S. 35).

## 5.2. Reaktion von 30S Untereinheiten mit DMA

Dimethyladipimidat Dihydrochlorid (DMA) (MG 245,16) ist ein bifunktionaler Imidoester und reagiert spezifisch mit freien Aminogruppen von Proteinen (Wold, 1967). DMA wurde von Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois, USA) bezogen.

246 mg DMA wurden in 125 ml TEAMK-Puffer<sup>+)</sup>  gelöst. Der pH dieser Ausgangslösung wurde mit 10 N KOH auf pH 8,5 gehalten. Ein Teil DMA-Lösung wurde unter intensivem Rühren bei 25°C zu einem Teil 30S Untereinheiten (100 OD<sub>260</sub>/ml TEAMK) gegeben (molares Verhältnis von DMA : 30S wie 1150:1). Während der 30-minütigen Inkubation wurde der pH mehrmals mit 0,1 N HCl auf pH 8,5 korrigiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde 2M NH<sub>4</sub>Cl zum Testansatz gegeben (1/10 Volumen des Ansatzes). Anschließend wurde das Gemisch für weitere fünf Minuten bei 25°C inkubiert, danach auf Eis gekühlt und sofort gegen TSM-Puffer dialysiert. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 3 Stunden bei 60000 Upm in einem 60 Ti-Rotor. Die Sedimente wurden in TSM-Puffer gelöst.

---

<sup>+)</sup>  Statt eines Tris-Puffers wurde der aminogruppenfreie Puffer Triäthanolamin verwendet, um eine Reaktion mit DMA auszuschließen.

Versuche mit dem monofunktionellen Methylhexanoimidat Hydrochlorid (MH) (MG 165,67) wurden analog durchgeführt, jedoch war der molare Überschuß von MH über 30S Untereinheiten doppelt so hoch gewählt wie der des bifunktionellen Reagens', so daß in beiden Fällen das molare Verhältnis von Ribosomen : Maleinimidgruppen 1 : 1150 betrug.

Wie oben beschrieben, wurden rekonstituierte 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H}$ -S5 bzw.  $^3\text{H}$ -S8 mit den Imidoestern behandelt. Da die verwendeten Volumina (ca. 100  $\mu\text{l}$ ) bei diesen Testen zu gering waren, konnte die pH-Verschiebung während der Reaktion nicht direkt kontrolliert werden. Zu diesem Zweck wurden gleichzeitig größere Reaktionsmische mit unmarkierten Untereinheiten angesetzt, wobei das molare Verhältnis von Ribosomen : Reagens unverändert blieb. Zu den kleinen Versuchsansätzen wurden in Relation zum Testvolumen entsprechenden Mengen 0,1 N HCl gegeben wie zu den großen Inkubationsgemischen.

Die Proteine modifizierter Ribosomen wurden standardmäßig über Cellulosephosphat-Ionenaustauschersäulen aufgetrennt (s. 4.a. auf S. 35).

## 6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Harnstoffgele: Zwei Arten von diskontinuierlichen Harnstoffgelen (pH 4,5) wurden verwendet: "Hard Gels" mit 10% Acrylamid und 0,75% N,N'-Methylenbis-Acrylamid und "Soft Gels" mit 10% Acrylamid und 0,15% N,N'-Methylenbis-Acrylamid (Voynow und Kurland, 1971). Die Elektrophorese wurde bei 3 mA/Gel so lange durchgeführt, bis der mit der Probe aufgetragene Farbstoff Pyronin-G das untere Ende der Gele erreicht hatte. Die Gele wurden über Nacht mit 0,25% Amidoschwarz in 7% Essigsäure gefärbt und anschließend in 7% Essigsäure elektrophoretisch entfärbt (5 mA/Gel).

Bei Versuchen mit radioaktiv markierten Proteinen wurden die Gele in 1 mm dicke Scheiben geschnitten und die einzelnen Gelscheibchen in Scintillationsgläsern in 0,15 ml Wasser und 1 ml "NCS Solubilizer" (Nuclear Chicago Corp.) gelöst. Die Proben wurden mindestens 8 Stunden bei 37°C geschüttelt und anschließend mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit (5,5 g PPO, 0,1 g POPOP pro 1000 ml Toluol) versetzt. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Scintillationszähler von Beckman (Modell LS 250) mit "Automatic Quench Correction" bestimmt.

SDS-Gele: Die kontinuierlichen Natrium Dodecyl Sulfat-(SDS-)Gele bestanden

aus 14,5% Acrylamid und 0,5% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid (Dunker und Rueckert, 1969). Im Gegensatz zu Dunker und Rueckert enthielten die Gele 8 M Harnstoff. Proben von ca. 50  $\mu$ l wurden auf die Gele (10 cm x 6 mm  $\emptyset$ ) polymerisiert. Die Dauer der Elektrophorese, die bei 50 V durchgeführt wurde, richtete sich nach der Wanderungszeit des Farbstoffs Bromphenolblau. Die Gele wurden für mindestens zwei Stunden mit 0,25% Coomassie Brilliant Blue in 7% Essigsäure und 5% Methanol gefärbt und in 7%iger Essigsäure mit 30% Methanol entfärbt.

## 7. Immunologische Methoden

### 7.1. Präparation von Antiseren, unfraktionierten $\gamma$ -Globulinen und IgG-Antikörpern gegen ribosomale Einzelproteine

Die zur Immunisierung von Kaninchen, in einigen Fällen auch von Schafen, verwendeten ribosomalen Einzelproteine wurden mittels Säulenchromatographie über Carboxymethylcellulose und Sephadex G-100 in einem Pyridiniumformiat-Puffer mit 6 M Harnstoff aufgetrennt (Hindennach et al., 1971a,b). Die Einzelproteine wurden mit folgenden Methoden auf ihre Reinheit untersucht:

1. Eindimensionale Disc-Gelelektrophorese (Leboy et al., 1964);
2. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a,b);
3. Celluloseacetat-Elektrophorese (Stöffler, 1967);
4. Immunelektrophorese (Stöffler und Wittmann, 1971a).

Die Immunisierungsprozedur wurde von Stöffler und Wittmann (1971a) beschrieben. Mischrassigen Kaninchen wurde vor Beginn einer Immunisierung Blut aus der Ohrvene entnommen, um ein Kontrollserum, ein sog. Präimmun- oder Nonimmun-Serum (NIS), zu gewinnen. An den Tagen 0, 21 und 28 wurden den Tieren jeweils 200-500  $\mu$ g gereinigtes Einzelprotein intramuskulär und subcutan an verschiedenen Körperstellen verabreicht. Als Adjuvantien wurden dabei verwendet:

1. Natrium Alginat (Medical Alginates Ltd., Grennford, England);
2. Unvollständiges Freund's Adjuvans (Difco Labs, Detroit, Michigan, USA) oder
3. Vollständiges Freund's Adjuvans (Difco Labs).

Mit allen drei Adjuvantien wurden Seren vergleichbarer Titer gewonnen.

40 Tage nach der ersten Injektion von Antigen wurde in Intervallen von 10 Tagen Blut abgenommen. Zur Gewinnung von Hyperimmunseren erhielten die Tiere alle zwei bis fünf Wochen "Booster"-Injektionen in einer Dosierung von 250-400  $\mu$ g Einzelprotein.



Unfraktionierte  $\gamma$ -Globuline und IgG-Antikörper wurden wie folgt präpariert: Der  $\gamma$ -Globulinanteil der Antiseren wurde bei ca. 33%iger Sättigung an  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei pH 8 ausgefällt (1,1 Volumen gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung + 2 Volumina Serum). Der Niederschlag wurde in gepufferter Kochsalzlösung (0,02 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,9% NaCl) suspendiert, wobei die  $\gamma$ -Globuline je nach Titer des behandelten Antiserums entweder in einem Volumen, das dem Ausgangsvolumen des Serums entsprach, oder in einem geringeren Volumen gelöst wurden. Die  $\gamma$ -Globulin-Präparationen - im allgemeinen vierfach angereichert - wurden zur Isolierung von IgG-Antikörpern über Sephadex G-150-Säulen in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 M NaCl aufgetrennt. Die IgG-Fraktionen wurden gefriergetrocknet und bei 4°C gelagert (Maschler, 1973; Maschler, Hasenbank und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse).

Eine grobe Titerbestimmung der Antiseren,  $\gamma$ -Globulin- und IgG-Präparationen erfolgte mittels der zweidimensionalen Immuno-Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony (1958) (s. nachfolgend 7.2.). Zum Nachweis der Reinheit wurden die Antikörper sowohl mit Hilfe der Doppeldiffusionstechnik als auch immunoelektrophoretisch gegen gereinigte Einzelproteine getestet (Stöffler und Wittmann, 1971a, b; Maschler, Hasenbank und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse; Tischendorf, Hasenbank, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse).

## 7.2. Zweidimensionale Immuno-Doppeldiffusionsmethode

Die Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony (1958) wurde im Makro- und Semimakromaßstab durchgeführt.

Makromaßstab: 25 ml 1,5%ige Agarose (Behring Werke, Marburg) in Ouchterlony-Puffer I<sup>\*)</sup> wurden in quadratische Plastik-Petrischalen (8,8 x 8,8 cm) (Lab-Tek Products, Westmont, Illinois, USA) gegossen. Mit Hilfe von Schablonen und Korkbohrern wurden um ein zentrales Loch sechs periphere Löcher in die erkaltete Agarose gestanzt. Der Abstand zwischen dem zentralen Loch und den peripheren Löchern betrug jeweils 11 mm (von Lochzentrum zu Lochzentrum). Mit einer an ein Vakuum angeschlossenen Pasteurpipette wurden die Löcher von Agaroseresten befreit. Die Löcher hatten ein Fassungsvermögen von 100  $\mu$ l. 0,5-1,8  $\mu$ g isolierte ribosomale Einzelproteine bildeten mit 100  $\mu$ l homologem Antiserum in der Regel Präzipitationslinien in Äquivalenz.

Semimakromaßstab: 12 ml 1,5%ige Agarose, die in Ouchterlony-Puffer II<sup>\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Die Puffer enthielten jeweils 0,02% Cialit bzw. Na-Azid zur Verhinderung von Bakterienwuchs.

gelöst war, wurden auf Glasplatten (8,2 x 8,2 cm) gegossen. Um ein zentrales Loch wurden sechs periphere Löcher angeordnet (jeweils 8 mm Abstand zwischen dem zentralen Loch und den Löchern auf der Peripherie). Die Löcher hatten einen Durchmesser von ca. 2 mm und faßten 8-10  $\mu$ l. Die Löcher wurden häufig mehrmals mit Antigenlösungen bzw. Antiseren nachgefüllt. Dabei wurde stets darauf geachtet, daß die Löcher zwischen den einzelnen Füllungen nicht austrockneten. Im allgemeinen wurden 0,5-2  $\mu$ g Einzelprotein und 10-40  $\mu$ l homologes Antiserum eingesetzt, um die Präzipitationslinie in Äquivalenz zu halten.

Die Immunodiffusionsplatten wurden für 6-60 Stunden in einer feuchten Inkubationskammer bei Raumtemperatur entwickelt. Ohne Wässerung und Färbung konnten die Präzipitationslinien bei Beleuchtung über einem Dunkelfeld fotografiert werden.

### 7.3. Absorption von Antikörperpräparationen mit dem jeweils homologen Protein

20 mg gefriergetrocknetes IgG wurden in 1,0 ml einer gepufferten Kochsalzlösung (0,02 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,9% NaCl) oder im selben Volumen TMA II-Puffer gelöst. 30  $\mu$ g des homologen Antigens, das in 2  $\mu$ l 6 M Harnstoff gelöst war, wurde mit dem IgG inkubiert (60 Minuten bei 30°C) und über Nacht bei 0°C gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert (10 Minuten, 10000 Upm) und der Überstand erneut mit 15  $\mu$ g (1  $\mu$ l) desselben Proteins versetzt. Nach Inkubationsschritten, wie oben beschrieben, wurde der Ansatz entsprechend zentrifugiert. Während das Sediment verworfen wurde, konnte der Überstand, der den unreaktierten IgG-Anteil enthielt, direkt zur Inkubation mit Ribosomen verwendet werden. Zur Lagerung wurde der Überstand gegen 0,001 M Kaliumphosphat dialysiert und anschließend gefriergetrocknet (Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b).

### 7.4. Fraktionierung von Ribosomen-Antikörper-Komplexen mittels Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation

#### 7.4.1. 30S Untereinheiten-Antikörper-Komplexe

<sup>3</sup>H-markierte, dissoziierte 70S Ribosomen: 3,0 OD<sub>260</sub> <sup>3</sup>H-aminosäuremarkierte 70S Ribosomen wurden in TMA II-Puffer in ihre Untereinheiten dissoziiert und anschließend für 5 Minuten bei 0°C mit IgG-Präparationen gegen 30S-ribosomale Einzelproteine inkubiert. In 500  $\mu$ l Endvolumen wurden

IgG-Konzentrationen zwischen 0,3 und 1,8 OD<sub>280</sub> verwendet. 0,3 OD<sub>280</sub> entsprach dabei "1 IgG-Konzentrationseinheit". Über Rohrzucker-Dichtegradienten (10-30%, w/w, in 0,001 M MgCl<sub>2</sub>, pH 6,9) wurden die Reaktionsansätze mit einem SW 40-Rotor in einer Spinco-Ultrazentrifuge aufgetrennt (13 Stunden, 23000 Upm, 4°C). Die Prozedur ist im einzelnen von Stöffler et al. (1973) berichtet worden.

Unmarkierte, isolierte 30S Untereinheiten: 1,0 OD<sub>260</sub> isolierte 30S Untereinheiten wurde für 5 Minuten bei 0°C in 500 µl TMA II-Puffer (Endvolumen) mit IgGs gegen Einzelproteine der kleinen Untereinheit inkubiert. Die IgG-Konzentration variierte zwischen 0,15 und 2,4 OD<sub>280</sub>/Reaktionsansatz. Bezogen auf 1,0 OD<sub>260</sub> 30S Untereinheiten wurde 0,3 OD<sub>280</sub> IgG/Ansatz als "1 IgG-Konzentrationseinheit<sub>30S</sub>" gesetzt. Die Inkubationsgemische wurden auf Rohrzucker-Dichtegradienten geschichtet (10-30%, w/w, in TMA II-Puffer) und in einem SW 40-Rotor 16 Stunden bei 23000 Upm (4°C) zentrifugiert.

Für die elektronenoptischen Untersuchungen wurden die Untereinheiten entweder in TMA II-Puffer, in einem TMA II entsprechenden Puffer, jedoch mit 1 mM MgCl<sub>2</sub>, oder in 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 20 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 500 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM Dithiothreitol (DTT) inkubiert. In jedem Fall wurden die Untereinheiten 20 Minuten bei 40°C hitzeaktiviert (Zamir et al., 1971).

#### 7.4.2. 50S Untereinheiten-Antikörper-Komplexe

Unter entsprechenden Bedingungen, wie für isolierte 30S Untereinheiten beschrieben, wurden 2,0 OD<sub>260</sub> isolierte 50S Untereinheiten mit Antikörpern gegen 50S-Einzelproteine inkubiert. Die gewählten IgG-Konzentrationen lagen zwischen 0,3 und 2,4 OD<sub>280</sub>/Reaktionsansatz. Bezogen auf 2,0 OD<sub>260</sub> 50S Subpartikel wurde 0,3 OD<sub>280</sub> IgG als "1 IgG-Konzentrationseinheit<sub>50S</sub>" bezeichnet. In einigen Fällen wurden unfractionierte γ-Globulin-Präparationen gegen Einzelproteine verwendet (50-150 µl). Die Auftrennung der 50S Untereinheiten-Antikörper-Inkubationsgemische erfolgte mittels Gradientenzentrifugation, wie zuvor beschrieben, jedoch wurde die Laufzeit auf 13 Stunden bei 23000 Upm (4°C) verkürzt.

#### 7.4.3. 70S Ribosomen-Antikörper-Komplexe

2,0 OD<sub>260</sub> undissoziierte 70S Ribosomen wurden mit einzelproteinspezifischen IgGs - in einigen Fällen auch mit unfractioniertem γ-Globulin - 5 Minuten in 500 µl Hepes-Inkubationspuffer inkubiert. Zwischen 0,2 und 1,6 OD<sub>280</sub> IgG/

Reaktionsansatz bzw. 50-100  $\mu$ l  $\gamma$ -Globulin/Ansatz wurden eingesetzt.

0,2 OD<sub>280</sub> IgG, inkubiert mit 2,0 OD<sub>260</sub> 70S Ribosomen, entsprach "1 IgG-Konzentrationseinheit<sub>70S</sub>". Die Inkubationsgemische wurden auf 10-30%ige (w/w) Zuckergradienten aufgetragen (in Hepes-Inkubationspuffer) und in einem SW 40-Rotor 13 Stunden bei 18000 Upm (4°C) zentrifugiert.

Die Gradienten wurden durch Absaugen der Zuckerlösung vom Boden der Gradientenröhrchen geerntet, wobei die Fraktionen kontinuierlich durch eine Durchlaufküvette eines Spektralphotometers (Zeiss PM4) gepumpt wurden. %-Transmission bei 260 nm wurde mittels eines Schreibers aufgezeichnet (Kipp und Zonen). Bei den Untersuchungen mit reinen 50S Untereinheiten und <sup>3</sup>H-70S Ribosomen wurde eine Durchlaufküvette von Uvicord-LKB mit einem Filter für 260 nm benutzt und zur Registrierung der Trennungsprofile ein W+W-Electronic-Hi Speed Recorder verwendet.<sup>+)</sup>

Bei den Experimenten mit <sup>3</sup>H-markierten 70S Ribosomen wurden 60 Fraktionen von je 4 Tropfen direkt in Scintillationsgläsern aufgefangen. 0,5 ml Wasser und 10 ml Instagel (Packard) wurden zu jeder Fraktion gegeben. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Packard-Scintillationszähler (3380 AAA).

#### 7.4.4. Quantitative Abschätzung der beobachteten Reaktionseffekte bei Versuchen mit unmarkierten Ribosomen an Hand von Standardtrennungsprofilen

Verschiedene Konzentrationen unbehandelter Untereinheiten wurden auf Rohr-zucker-Dichtegradienten aufgetrennt, die Transmissionsprofile standardmäßig aufgezeichnet und die Gipfelhöhen (und -formen) den eingesetzten Ribosomenkonzentrationen zugeordnet. In halblogarithmischem Maßstab war die Gipfelhöhe von der Partikelkonzentration linear abhängig. Die Konzentration von Ribosomen bzw. Ribosomen-Antikörper-Komplexen unter den beobachteten Gipfeln konnten mit einem relativen Fehler von  $\pm$  10% ermittelt werden. Konzentrationsbestimmungen mit radioaktiven Ribosomen waren mit derartigen Abschätzungen in guter Übereinstimmung (s. Abschnitt D.I.2.5.).

---

<sup>+) Die Experimente mit isolierten 50S Untereinheiten und <sup>3</sup>H-70S Ribosomen konnten freundlicherweise am Institut für experimentelle und klinische Virologie bei Professor K. O. Habermehl und Professor W. Diefenthal durchgeführt werden.</sup>

## 7.5. Fraktionierung von Protein-Antikörper-Komplexen mittels Säulenchromatographie

Das extrahierte Gesamtproteingemisch DMA-behandelter 30S Untereinheiten mit einem  $^3\text{H}$ -Protein wurden gegen Säulen-Puffer II dialysiert und mit Rinderse-  
rumalbumin<sup>\*)</sup> (1% Endkonzentration) versetzt. 100 µg 30S-Gesamtprotein mit  
ca. 5000 cpm des  $^3\text{H}$ -Proteins wurden je nach Titer der verwendeten Antiseren  
gegen 30S-Einzelproteine mit 20-150 µl Serum in Polypropylen-Teströhrchen<sup>\*)</sup>  
für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Das Endvolumen der Ansätze war im allge-  
meinen 500 µl. Die Inkubationsgemische wurden auf kleinen mit Säulen-Puf-  
fer II äquilibrierten Molekularsiebsäulen (BioGel P-150, 100-200 Mesh, Bio-  
Rad, Richmond, Kalifornien, USA) mit Dimensionen von 15 x 0,6 cm Ø aufge-  
trennt. Protein-Antikörper-Komplexe wurden aufgrund ihrer Größe im ausge-  
schlossenen Volumen der Säule separiert. Fraktionen von drei Tropfen  
(~120 µl) wurden in Scintillationsgläsern aufgefangen und mit 10 ml wasser-  
aufnehmender Scintillationsflüssigkeit (5,5 g PPO, 0,1 g POPOP, 667 ml  
Toluol, 333 ml Triton X-100, 100 ml Wasser) vermischt. Die Radioaktivität  
wurde in einem Scintillationszähler von Beckman (LS-250) mit "Automatic  
Quench Correction" bestimmt.

## 7.6. Immunelektronenmikroskopie

### 7.6.1. Präparation von Proben für die Elektronenmikroskopie

Gipfelfraktionen mit unbehandelten Kontroll-Untereinheiten und Fraktionen  
mit Untereinheiten-Antikörper-Untereinheiten-Komplexen ("Dimeren") bzw. un-  
vernetzten Untereinheiten wurden von den Rohrzucker-Dichtegradienten geernt-  
et (s. 7.4.) und direkt für die Präparation der Proben für die Elektronen-  
mikroskopie verwendet. In Anlehnung an die von Valentine et al. (1968) be-  
schriebene Methode wurde dünner Kohlefilm, der auf frischgespaltenen Glim-  
merplättchen aufgedampft war, auf die Oberfläche der Zuckerlösung mit den  
Ribosomen (0,5 ml; 0,2-1,0 OD<sub>260</sub>/ml) überführt. Die Adsorption der Partikel  
an den Kohlefilm dauerte je nach Ribosomenkonzentration 1-3 Minuten bei  
0°C. In 0,5% Uranylacetat (pH 4,4) wurde dieser Film bei 0°C 1-10 Minuten  
negativ kontrastiert ("Negative Staining") und anschließend durch Adsorp-  
tion auf ein gefenstertes, Kollodium-befilmtes Gitter ("Holey Grid")

---

<sup>\*)</sup> Rinderse-  
rumalbumin im Testansatz und Polypropylen-Testgläser wurden ver-  
wendet, um unspezifisches Anhaften ribosomaler Proteine an den Testgefäß-  
wänden so gering wie möglich zu halten.



gebracht. Dieses Gitter war vorher mit einer extrem dünnen Kohleschicht stabilisiert worden (Huxley und Zubay, 1960). Nachdem die Proben ca. 30 Sekunden bei Zimmertemperatur getrocknet waren, ließ man einen zweiten auf Uranylacetat treibenden Kohlefilm auf das gefensterete Gitter aufschwimmen, und zwar auf die noch freie Seite der adsorbierten, bereits "gefärbten" Partikel. Das Gitter wurde zusammen mit beiden Filmen aus der Lösung genommen und getrocknet.

Diese "Sandwich"-Technik, durch die eine Verminderung der allgemeinen Kontrastierung beim Absaugen überflüssigen Uranylacetats mittels Filterpapier verhindert wird, war ähnlich der von Wabl et al. (1973b) beschriebenen. Die Verwendung eines zweiten "vorgefärbten" Kohlefilms bei den Untersuchungen dieser Arbeit ergab jedoch verbesserte Resultate. Der neueingeführte "Sandwich", der das ganze Gitter bedeckte, erlaubte eine intensive und homogene Kontrastverteilung. Dadurch wurde die "Sandwich"-Methode wesentlich verlässlicher und einfacher zu handhaben.

#### 7.6.2. Elektronenmikroskopie

Die elektronenoptischen Untersuchungen wurden mit einem Siemens Elmiskop I A durchgeführt. Die gewählte Endvergrößerung des Mikroskops war X 40000 bei einer Hochspannung von 80 kV. Es wurde Feinstrahlbeleuchtung (Doppelkondensor) mit einer Objektivaperturblende von 50  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Gitter wurden im Mikroskop mit der Probenseite von der Elektronenquelle abgewandt orientiert (Finch und Klug, 1965). Zur Herstellung fotografischer Abzüge waren die Fotoplatten mit der Emulsionsseite zur Bromidschicht des Fotopapiers gerichtet. Den stärksten Kontrast zeigten Partikel, die sich in "Sandwich"-Regionen über Löchern des Kollodiumfilms befanden.

Die "Materialien und Methoden" für die Immunelektronenmikroskopie sind im Detail von Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler (1974a) beschrieben.

## D. Resultate

### I. Erreichbarkeit ribosomaler Proteine *in situ* für spezifische Antikörper

#### I.1. Einleitung

Im ersten Teil dieser Arbeit wird untersucht, ob Antikörper, die gegen isolierte, reine ribosomale Einzelproteine gerichtet sind, mit ihren entsprechenden Proteinen auch im intakten Ribosom reagieren. Zu diesem Zweck wurden Ribosomen mit diesen Antikörpern inkubiert und die Inkubationsgemische mittels Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation auf etwaige Reaktionsprodukte analysiert. Es wurde erwartet, daß die Ribosomen durch die Bindung spezifischer Antikörper in ihrem Sedimentationsverhalten verändert werden und somit Rückschlüsse auf die Zugänglichkeit der antigenen Proteine an der Ribosomenoberfläche möglich sind.

Isolierte 30S- bzw. 50S-ribosomale Untereinheiten und undissoziierte 70S Ribosomen wurden vergleichsweise auf ihre Proteinzugänglichkeit für Antikörper untersucht, um Aussagen über Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter 70S Ribosomen treffen zu können: In 70S Ribosomen sollte jede der beiden ribosomalen Subpartikel durch die Wechselwirkung mit der Schwesteruntereinheit an Teilen ihrer Oberfläche abgedeckt sein. Folglich konnte davon ausgegangen werden, daß ein Protein, das in 70S Ribosomen unzugänglich, in isolierten Untereinheiten jedoch erreichbar ist, im Untereinheiten-Grenzbereich vorliegt.

#### I.2. Ergebnisse

##### I.2.1. Auswahl der für die erste Versuchsserie verwendeten Antiseren

Die folgenden Experimente zur Bestimmung der Zugänglichkeit ribosomaler Proteine in situ wurden mit Immunglobulin-G- (IgG-) Präparationen aus Standard-Antiseren gegen ribosomale Einzelproteine durchgeführt. Gegen jedes Einzelprotein standen mehrere (2-8) Antiseren aus verschiedenen Tieren zur Verfügung. Die Immunisierung verschiedener Tiere mit ein und demselben Antigen führte zur Bildung von Antiseren mit unterschiedlichem Titer und teilweise abweichender Determinantenspezifität (siehe Abschnitt 5. der Einleitung sowie Abschnitt I.2.4.2.). Die Präzipitationstiter aller Antiseren und der aus ihnen gewonnenen IgG-Antikörper wurden mittels Immuno-Doppeldiffusion nach Ouchterlony (1958) bestimmt: 100 µl Antiserum bzw. 1-2 mg Immunglobulin-G

wurden in Versuchen im "Makromaßstab" gegen 0,2-3 µg des jeweiligen ribosomalen Einzelproteins getestet (s. "Materialien und Methoden"). Mit 0,5-1,8 µg antigenem Protein wurde dabei im allgemeinen eine Präzipitationslinie in Äquivalenz gebildet. Unter Berücksichtigung eines Molekulargewichts von durchschnittlich 20000 Dalton für ribosomale Einzelproteine und 150000 Dalton für IgG-Antikörper ergaben sich molare Verhältnisse von 74-530 Antikörper/isoliertes Einzelprotein.<sup>\*)</sup> IgGs der titerstärksten Antisera wurden für die folgenden Versuchsserien verwendet.

### I.2.2. Inkubation von 30S Untereinheiten mit Antikörpern

In einer ersten Versuchsserie wurden isolierte 30S Untereinheiten mit Anti-S1, -S2, ... bis -S21 (außer Anti-S17) inkubiert, die Reaktionsansätze auf Rohrzucker-Dichtegradienten aufgetrennt und die Transmissionsprofile gemessen (s. "Materialien und Methoden"). Das molare Verhältnis von Antikörpern/30S Untereinheit variierte zwischen ca. 20 und 200 IgGs/Untereinheit.<sup>\*)</sup> In der Regel lag das Verhältnis bei 45-90 IgGs/Subpartikel. (Für die Reaktionsabhängigkeit von der Antikörperkonzentration s. Abschnitt I.2.4.1., Tabellen 3 u. 5.)

Inkubation von Antikörperpräparationen aus Seren verschiedener nichtimmunisierter Tiere (sogenannten NIS-IgGs) mit 30S Untereinheiten hatte keinen Effekt auf das Sedimentationsverhalten der Ribosomen; diese Untereinheiten sedimentierten wie unbehandelte 30S Partikel. Hingegen bewirkten Antikörper gegen 16 der 30S-Einzelproteine drastische Veränderungen der Sedimentationsmuster im Vergleich zu den Kontrollprofilen (Abb. 3, s. Anti-S2 bis -S7, Anti-S9 bis -S15, Anti-S18, -S20 und -S21). Die Effekte von Anti-S1, -S8, -S16 und -S19 waren gering (Abb. 3).

---

<sup>\*)</sup> Die molaren Verhältnisse lagen derart hoch, weil selbst in IgG-Populationen aus Hyperimmunseren nur 1-3% der IgGs gegen ihr Antigen spezifisch sind (s. Abschnitt 5. der Einleitung).

---

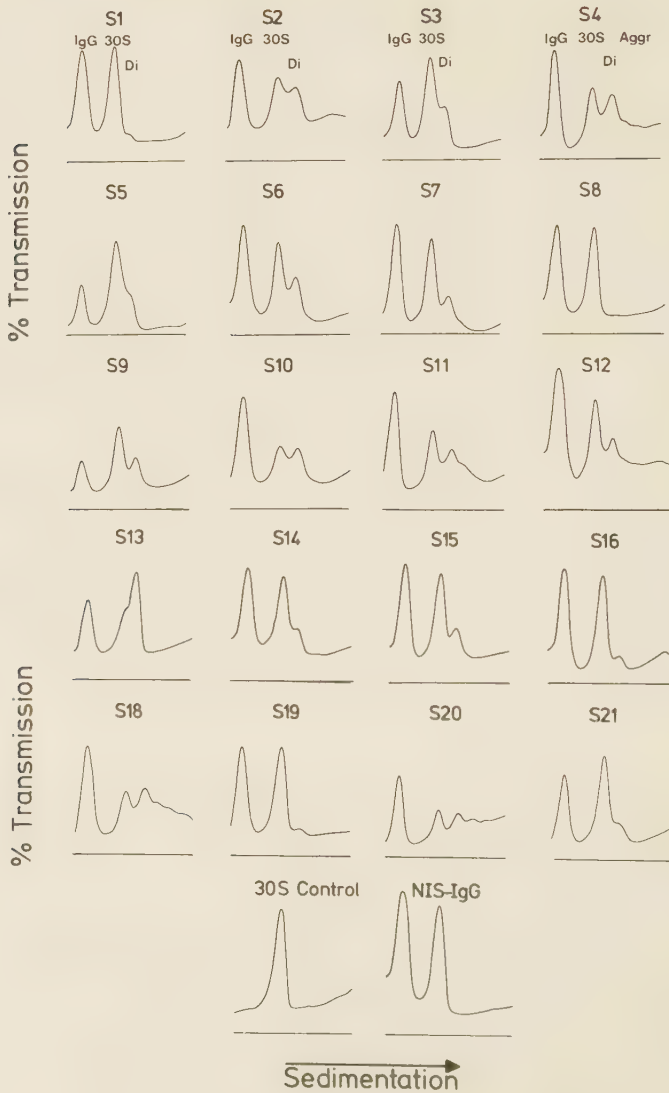
### Legende zu Abbildung 3:

Je 1,0 OD<sub>260</sub> 30S Untereinheiten wurde mit IgGs gegen 30S-Einzelproteine inkubiert (s. "Materialien und Methoden"). Die "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>30S</sub>" sind aus Tabelle 3 zu entnehmen (s. ( § ) in Spalte "Antikörper von Tiernummer"). 30S Untereinheiten wurden zur Kontrolle mit 9 "Einheiten" NIS-IgG inkubiert.

Die Gipfelfraktionen enthalten folgende Komponenten (in Sedimentationsrichtung): IgG-Antikörper, unvernetzte 30S, 30S-IgG-30S-Komplexe ("Dimere"), höhervernetzte 30S-IgG-Komplexe (Aggregate) (als Beispiel s. S18).

Die Transmissionsprofile wurden in einer Durchlaufküvette eines Zeiss-(PM4) Spektralphotometers bei 260 nm gemessen und mit einem Schreiber (Kipp und Zonen) registriert.

Abb. 3. Rohrucker-Dichtegradienten - Effekte von Anti-S1, -S2, ... bis -S21 auf isolierte 30S Untereinheiten



Legende s. S. 47.

Tabelle 1. Semiquantitative Auswertung der Antikörpereffekte auf isolierte 30S Untereinheiten

| Effekte des Antikörpers  |            | Antikörper gegen ribosomales Protein     |
|--------------------------|------------|------------------------------------------|
| Reduktion                | stark      | S20 > S18 > S10, S13 > S2, S4, S11 > S9  |
|                          | mittel     | S12 > S3, S5, S6, S7, S14, S15, S21      |
|                          | schwach    | S8, S16, S19 > S1                        |
|                          | keine Red. | diverse NIS-IgGs                         |
| ausschließlich Dimere    |            | S13 >> S3, S6                            |
| ausschließlich Aggregate |            | S8                                       |
| Dimere + Aggregate       |            |                                          |
| vorwiegend Dimere        |            | S12 > S5 > S7, S14, S15, S21 > S19 > S1  |
| vorwiegend Aggregate     |            | S20 > S18 > S10, S11 > S2, S4 > S9 > S16 |

Die Trennungsprofile der einzelnen Experimente sind in Abbildung 3 dargestellt. Detaillierte quantitative Auswertungen der Versuche werden in Tabelle 3 gegeben (s. §) in Spalte "Antikörper von Tiernummer" ).

|                   |                                |              |
|-------------------|--------------------------------|--------------|
| Starke Reduktion: | Verminderung des 30S-Gipfels ) |              |
|                   | auf <50% Restmenge )           | im Vergleich |
| Mittlere "        | Verminderung des 30S-Gipfels ) |              |
|                   | auf >50% - 70% Restmenge )     | zur          |
| Schwache "        | Verminderung des 30S-Gipfels ) | Kontrolle    |
|                   | auf >70% - 90% Restmenge )     |              |



Die Effekte der einzelnen Antikörper auf das Sedimentationsverhalten von 30S Untereinheiten sind unterschiedlich. So wurden allein oder gleichzeitig beobachtet:

1. Reduktion des Gipfels der 30S Untereinheiten ("Monomeren").
2. Bildung von 30S-IgG-30S-Komplexen ("Dimeren"), deren Sedimentationskonstante annähernd der von 50S Untereinheiten entspricht (ca. 45S).
3. Formation höhervernetzter 30S-IgG-Komplexe einschließlich großer Aggregate, die sich im Dichtegradienten nicht mehr auftrennen lassen und auf den Gradientenboden sedimentieren (Präzipitate).

Zum quantitativen Abschätzen der einzelnen Effekte (Tabelle 1, s. auch Tabelle 3) wurden die Transmissionsprofile ausgewertet, wie in "Materialien und Methoden" (Abschnitt 7.4.4.) beschrieben.

### 1. Reduktion des 30S-Monomeren-Gipfels

Die Verminderung des 30S-Monomeren-Gipfels wurde als ein wesentliches Kriterium für die Erreichbarkeit ribosomaler Proteine in situ gewertet. Der Grad der Reduktion ist ein Maß für die Reaktion von Ribosomen mit Antikörpern.

Die Mehrzahl der Antikörper führte zu einer deutlichen Verminderung des 30S-Gipfels (Tabelle 1). Lediglich Anti-S1, -S8, -S16 und -S19 bewirkten jeweils eine nur schwache Reduktion. Da diese geringe Veränderung der Trennungsmuster im Gegensatz zu Kontrollexperimenten mit NIS-IgG reproduzierbar auftrat, wurden auch diese Ergebnisse positiv ausgewertet.

### 2. Bildung von 30S-IgG-30S-Komplexen ("Dimere")

Nahezu alle Antikörper führten neben der erwähnten Reduktion des 30S-Gipfels zur Bildung von schneller sedimentierenden Partikeln, die eine Sedimentationskonstante von ca. 45S hatten (Abb. 3 u. Tabelle 1). Es wurde angenommen, daß diese Partikel Komplexe aus zwei 30S Untereinheiten sind, die durch einen bivalenten IgG-Antikörper verknüpft werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten diese Annahme (s. Ergebnisteil III.). Diese 30S-IgG-30S-Komplexe werden forthin "Dimere" genannt.

Anti-S13 bildete die größte Menge solcher Dimere (Abb. 3 u. Tabelle 1). Fast alle übrigen Antikörper bewirkten eine deutliche, wenn auch nicht so starke Bildung von Dimeren, die jeweils in einem diskreten Gipfel separiert wurden. Lediglich die durch Anti-S3, -S5 bzw. -S14 erzeugten Dimere waren nur als

Schulter von dem 30S-Gipfel abgetrennt. Es könnte sich dabei um 30S-IgG-30S-Komplexe handeln, die im Schwerfeld wieder dissoziierten. Anti-S8 war die einzige Antikörperpräparation, die parallel zur Reduktion des Monomeren-Gipfels keine Dimerbildung verursachte.

### 3. Formation höhervernetzter 30S-IgG-Komplexe

Die meisten Antikörper bewirkten die Bildung von 30S-IgG-Komplexen, die schneller als Dimere sedimentierten: Die quantitativen Abschätzungen der Reduktions- und Dimer-Effekte ergaben, daß nur bei drei Antikörpern (Anti-S3, -S6 und -S13) das Material unter den 30S-Monomeren- und Dimeren-Gipfeln der Ausgangsmenge von 30S Untereinheiten entsprach, die auf den Gradienten aufgetragen wurde (Tabelle 1, s. auch Tabelle 3). Diese höhervernetzten Komplexe waren in einigen Fällen im Gradienten noch aufzutrennen oder sedimentierten aufgrund ihres hohen Vernetzungsgrades als Präzipitate auf den Gradientenboden.<sup>\*)</sup>

Allein Anti-S8 bildete ausschließlich höhervernetzte, im Gradienten nicht mehr auftrennbare Komplexe und - wie bereits ausgeführt - keine Dimere (Tabelle 1). Außer Anti-S3, -S6 und -S13, die nur zu Dimerbildung führten, produzierten alle übrigen Antikörper größere Aggregate und Dimere. In einigen Fällen überlagerte dabei deutlich der Anteil an Aggregaten. Die Trennungsprofile für 30S Untereinheiten, die mit Anti-S4, -S11, -S18 und -S20 inkubiert wurden, zeigten typische Beispiele für Komplexe, die schneller als Dimere sedimentierten, im Gradienten aber noch aufzutrennen waren (Abb. 3). Die Trennungsmuster erinnern an Separationsprofile von Polysomen.

### 4. Zusammenfassung

Alle Antiseren gegen die 20 untersuchten Einzelproteine der 30S Untereinheit enthielten spezifische IgG-Antikörper, die mit ihrem entsprechenden Antigen auch in der intakten Untereinheit reagieren. Daraus konnte geschlossen werden, daß alle diese Proteine an der Oberfläche der 30S Subpartikel zugänglich sind.

---

<sup>\*)</sup> Die Abnahme ribosomalen Materials wurde nicht durch Zerfall der Ribosomen bedingt: Produkte, die langsamer als 30S Untereinheiten sedimentierten, wurden nicht beobachtet. Bei allen Versuchen wurden weder signifikante Erhöhungen der Basislinien im Gradientenabschnitt für leichtere Partikel als 30S Ribosomen beobachtet, noch nahm die Transmission bei 260 nm in den 7S-Gipfeln der Antikörper, verglichen mit NIS-IgG, zu.

### 1.2.3. Inkubation von 50S Untereinheiten mit Antikörpern

Die Erreichbarkeit der 34 ribosomalen Proteine an der Oberfläche der 50S Untereinheit für Antikörper wurde in entsprechender Weise wie für die Proteine der 30S Untereinheit untersucht (Abb. 4 u. Tabelle 2). In einer ersten Versuchsserie wurden 50S Untereinheiten mit Antikörpern gegen je eins der 50S-ribosomalen Proteine (Anti-L1, -L2, ... bis -L34) inkubiert (s. 'Materialien und Methoden')<sup>\*)</sup>. Gegen 18 der 50S-Proteine lagen IgG-Präparationen mit ausreichend starken Präzipitationstitern vor (s. Abschnitt 1.2.1.). In diesen Fällen wurden molare Verhältnisse zwischen Antikörpern und 50S Untereinheiten von 60-120 IgGs/Subpartikel gewählt (s. Tabellen 4 u. 5). Gegen die übrigen 16 Proteine wiesen die IgGs zu geringe Titer auf, deshalb wurden Gemische von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern in Form unfractionierter  $\gamma$ -Globulin-Präparationen verwendet. Je 150  $\mu$ l unfractioniertes  $\gamma$ -Globulin/2,0 OD<sub>260</sub> 50S Untereinheiten wurden eingesetzt. Die Verwendung von  $\gamma$ -Globulinen war zulässig, weil  $\gamma$ -Globuline aus Nonimmun-Seren ebenso wie die vergleichbaren IgGs keinen Einfluß auf das Sedimentationsverhalten von 50S Untereinheiten haben (Abb. 4).

Die Auftrennung der Ribosomen-Antikörper-Komplexe im Dichtegradienten ergab, daß jede der 33 spezifischen Antikörperpräparationen mit dem homologen Protein im 50S Ribosom reagierte (Abb. 4 u. Tabelle 2, s. auch Tabelle 4). Die Antikörper bewirkten wiederum typische Veränderungen der Sedimentationsmuster wie Reduktion des 50S-Monomeren-Gipfels, Dimerbildung und Formation höhervernetzter 50S-Antikörper-Komplexe.

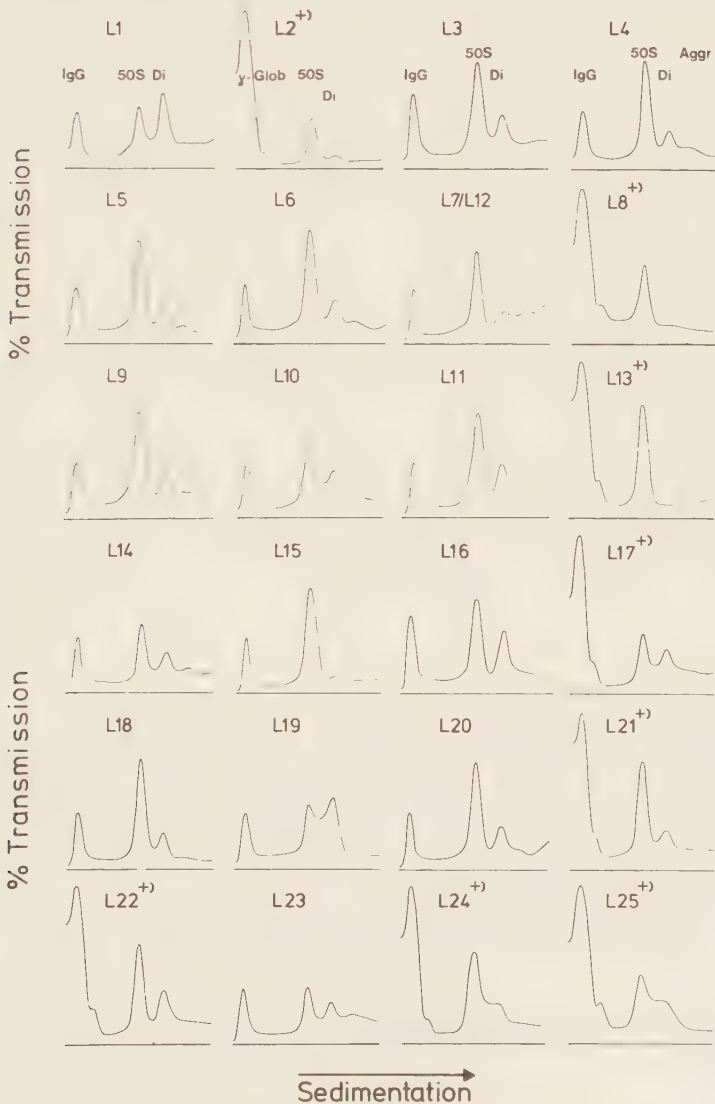
Antikörper gegen 21 Proteine führten zu deutlicher Reduktion des 50S Monomeren-Gipfels (Abb. 4 u. Tabelle 2). Die Antikörper gegen die übrigen 13 Einzelproteine zeigten schwächere Effekte. Die Wirkungen von sechs dieser Immunglobuline (Anti-L13, -L15, -L28, -L32, -L33 und -L34) waren sehr gering, konnten jedoch im Vergleich zu Kontrollen, bei denen 50S Untereinheiten mit NIS-Antikörpern inkubiert wurden, als eindeutig positiv angesehen werden.

Forts. S. 56

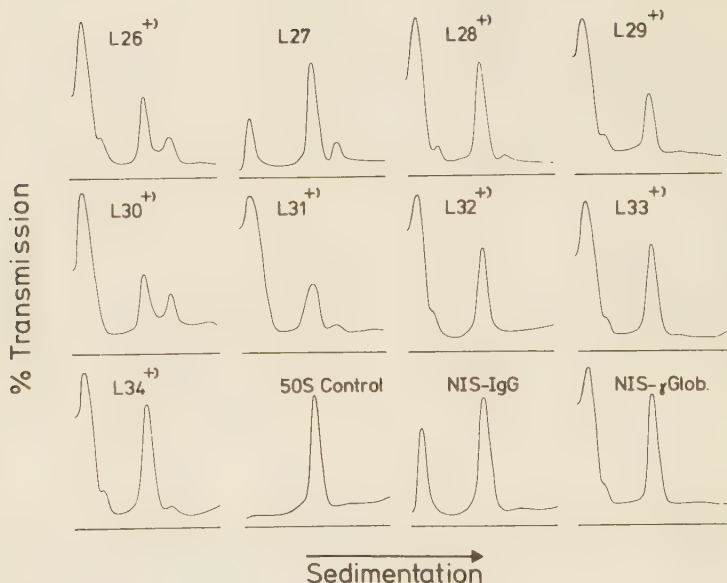
---

<sup>\*)</sup> Die Proteine L7 und L12 sind immunologisch identisch (Stöffler und Wittmann, 1971b). Deshalb werden Immunglobuline, die gegen isoliertes Protein L7 gerichtet sind, ebenso wie Antikörper gegen ein Gemisch von L7 und L12 als Anti-L7/L12 bezeichnet.

Abb. 4. Rohrucker-Dichtegradienten - Effekte von Anti-L1, -L2, ... bis -L34 auf isolierte 50S Untereinheiten



Fortsetzung: Abb. 4



Je 2,0 OD<sub>260</sub> 50S Untereinheiten wurden mit IgG-Präparationen gegen 50S-Einzelproteine, in einigen Fällen mit unfractionierten  $\gamma$ -Globulin-Aufarbeitungen ( + ), inkubiert (s. 'Materialien und Methoden'). Die "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>50S</sub>" bzw.  $\gamma$ -Globulin-Konzentrationen sind Tabelle 4 zu entnehmen (s. ( § ) ) in Spalte "Antikörper von Tiernummer". 50S Untereinheiten wurden zur Kontrolle mit 9 "Einheiten" NIS-IgG bzw. 150  $\mu$ l NIS- $\gamma$ -Globulin inkubiert.

Die Gipffractionen enthalten folgende Komponenten (in Sedimentationsrichtung): IgG-Antikörper, IgM- und/oder IgA-Antikörper (nur bei  $\gamma$ -Globulin), unvernetzte 50S, 50S-Antikörper-50S-Komplexe ("Dimere"), höhervernetzte 50S-Antikörper-Komplexe (Aggregate) (als Beispiele s. L2 und L14).

Die Trennungsprofile wurden in einer Durchlaufküvette (Uvicord-LKB) bei 260 nm gemessen und mit einem Schreiber (W+W-Electronic-Hi Speed Recorder) registriert.



Tabelle 2. Semiquantitative Auswertung der Antikörpereffekte auf isolierte SOS Untereinheiten

| Effekte des Antikörpers  |            | Antikörper gegen ribosomales Protein                                                                                                                                                                     |
|--------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Reduktion                | stark      | L2 <sup>+) , L23 &gt; L14, L17<sup>+) &gt; L1, L10, L19 &gt; L25<sup>+) &gt; L26<sup>+) , L31<sup>+) )</sup></sup></sup></sup></sup>                                                                     |
|                          | mittel     | L7/L12, L8 <sup>+) , L29<sup>+) , L30<sup>+) &gt; L16 &gt; L24<sup>+) &gt; L5, L20, L22<sup>+) , L32<sup>+) )</sup></sup></sup></sup></sup></sup>                                                        |
|                          | schwach    | L3, L9, L11, L15, L33 <sup>+) &gt; L4, L6, L21<sup>+) &gt; L13<sup>+) , L18, L28<sup>+) &gt; L27, L34<sup>+) )</sup></sup></sup></sup></sup>                                                             |
|                          | keine Red. | diverse NIS-IgGs u. - $\gamma$ -Globuline                                                                                                                                                                |
| ausschließlich Dimere    |            | L11, L22 <sup>+) &gt; L21<sup>+) &gt; L18 &gt; L27 &gt; L34<sup>+) )</sup></sup></sup>                                                                                                                   |
| ausschließlich Aggregate |            | L8 <sup>+) , L29<sup>+) &gt; L32<sup>+) &gt; L33<sup>+) )</sup></sup></sup></sup>                                                                                                                        |
| Dimere + Aggregate       |            |                                                                                                                                                                                                          |
| vorwiegend Dimere        |            | L1, L19 > L30 <sup>+) &gt; L16 &gt; L3 &gt; L5, L20 &gt; L6, L9 &gt; L4</sup>                                                                                                                            |
| vorwiegend Aggregate     |            | L2 <sup>+) &gt; L23 &gt; L14, L17<sup>+) , L31<sup>+) &gt; L7/L12, L10 &gt; L25<sup>+) , L26<sup>+) &gt; L24<sup>+) , L15 &gt; L13<sup>+) , L28<sup>+) )</sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup></sup> |

Die Trennungsprofile der einzelnen Experimente sind in Abbildung 4 dargestellt. Detaillierte quantitative Auswertungen der Versuche werden in Tabelle 4 gegeben (s. §) in Spalte "Antikörper von Tiernummer" ).

Starke Reduktion: Verminderung des SOS-Gipfels )  
auf  $\leq 50\%$  Restmenge ) im Vergleich

Mittlere " : Verminderung des SOS-Gipfels ) zur  
auf  $> 50\% - 70\%$  Restmenge )

Schwache " : Verminderung des SOS-Gipfels ) Kontrolle  
auf  $> 70\% - 90\%$  Restmenge )

<sup>+)unfraktionierte  $\gamma$ -Globulin-Präparation</sup>

29 der 33 Antikörper bildeten Dimere, die sich aus zwei 50S Untereinheiten und einem verknüpfenden Antikörper zusammensetzen (s. Ergebnisteil III.) und mit ca. 70S sedimentieren. Nur sechs Antikörper (Anti-L11, -L18, -L21, -L22, -L27 und -L34) riefen ausschließlich Dimerbildung hervor. Die Mehrzahl der Antikörperpräparationen ergab neben Dimeren auch noch höhervernetzte Aggregate, wobei in mehreren Fällen der Anteil an Aggregaten beträchtlich überwog (z.B. Anti-L2 und -L23; Abb. 4 u. Tabelle 2, s. auch Tabelle 4). Diese Komplexe waren meistens so hochvernetzt, daß sie auf den Gradientenboden sedimentierten. Formation größerer Aggregate, die in diskreten Gipffraktionien aufgetrennt wurden, war nur mit wenigen Antikörpern zu beobachten (z.B. Anti-L7/L12 und -L14; Abb. 4).

Antikörper gegen vier ribosomale Proteine (Anti-L8, -L29, -L32 und -L33) vernetzten die 50S Untereinheiten derartig stark, daß keine Dimere, sondern allein größere, im Gradienten nicht mehr auftrennbare 50S-Antikörper-Komplexe gebildet wurden (Abb. 4 u. Tabelle 2).

#### Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Alle Antikörper gegen die 34 Einzelproteine der 50S Untereinheit reagieren mit intakten 50S Subpartikeln. Wie für die 30S Untereinheit kann für die 50S Subpartikel gefolgert werden, daß jedes Protein an der Untereinheiten-Oberfläche erreichbar ist.

Aus den einzelnen Reaktionstypen, die bei den Versuchen mit bivalenten IgG-Antikörpern beobachtet wurden, können erste Schlüsse über die Zahl der am Ribosom zugänglichen Antikörperbindungsstellen gezogen werden: Dimerbildung setzt mindestens eine erreichbare antigene Determinante eines Proteins voraus; hingegen sollte zur Formation höhervernetzter Untereinheiten-Antikörper-Komplexe ein Protein mit mehreren Determinanten an der Ribosomenoberfläche zugänglich sein.

Das Auftreten größerer Aggregate bei den Versuchen mit unfractionierten  $\gamma$ -Globulin-Präparationen erlaubt diese zweite Schlußfolgerung nicht: Aufgrund der Multivalenz der im  $\gamma$ -Globulin enthaltenen IgM-Antikörper und Aggregate von IgA-Antikörpern reicht bereits eine zugängliche Antikörperbindungsstelle eines Proteins zur Bildung höhervernetzter Komplexe aus. So könnte ein einziges IgM-Molekül bis zu fünf Ribosomen gleichzeitig binden. Entsprechend ist für ein IgA-Aggregat die Bindung mehrerer Ribosomen nicht auszuschließen.

Tabelle 3. Effekte von Anti-S1, -S2, ... bis -S21 auf isolierte  
30S Untereinheiten -Quantitative Auswertung der Rohrzucker-  
Dichtegradientenprofile

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten 30S | % Restmenge<br>unter 30S-Mono-<br>meren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|------------------------|
| S1                             | 221 <sub>II</sub>                 | 2                                         | 90                                             | <10      | -                      |
|                                | §) 221 <sub>II</sub>              | 4                                         | 80 - 90                                        | <10      | + (10)                 |
| S2                             | 65                                | 4                                         | 60 - 70                                        | 20       | + (>10)                |
|                                | 147                               | 1                                         | 90 - 100                                       | 0        | -                      |
|                                | §) 147                            | 4                                         | 30 - 40                                        | 30       | + (>30)                |
|                                | 307                               | 4                                         | 30 - 40                                        | 20- 30   | + (40)                 |
| S3                             | 123 <sub>II</sub>                 | 0,5                                       | 90 - 100                                       | <10      | -                      |
|                                | §) 123 <sub>II</sub>              | 2                                         | 60 - 70                                        | >30      | -                      |
| S4                             | 67 <sub>II</sub>                  | 4                                         | 100                                            | 0        | -                      |
|                                | 67 <sub>II</sub>                  | 8                                         | >90                                            | <10      | -                      |
|                                | 194                               | 4                                         | 40 - 50                                        | 20       | + (>30)                |
|                                | 194                               | 6                                         | 40                                             | 20       | + (40)                 |
|                                | §) H 4                            | 4                                         | 30 - 40                                        | 30       | + (>30)                |
|                                | H 4                               | 8                                         | 20                                             | 20- 30   | + (>50)                |
| S5                             | 113                               | 0,5                                       | 80 - 90                                        | 10       | -                      |
|                                | §) 113                            | 1                                         | 60 - 70                                        | 20- 30   | + (10)                 |
|                                | 113                               | 2                                         | 30 - 40                                        | 30       | + (>30)                |
| S6                             | §) 114                            | 4                                         | 60 - 70                                        | 30       | -                      |
| S7                             | §) 125 <sub>II</sub>              | 4                                         | 60 - 70                                        | 20       | + (>10)                |

Fortsetzung: Tabelle 3

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten 30S | % Restmenge<br>unter 30S-Mono-<br>meren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|------------------------|
| S8                             | §) 77                             | 4                                         | 70 - 80                                        | 0        | + (>20)                |
|                                | 362                               | 4                                         | 90                                             | 0        | + (10)                 |
|                                | 362                               | 10                                        | 70 - 80                                        | 10       | + (>10)                |
| S9                             | §) 132 <sub>II</sub>              | 1                                         | 50                                             | 20       | + (30)                 |
| S10                            | §) 173 <sub>II</sub>              | 4                                         | 30                                             | 30       | + (40)                 |
| S11                            | 222 <sub>III</sub>                | 2                                         | 50 - 60                                        | 20-30    | + (20)                 |
|                                | §) 222 <sub>III</sub>             | 4                                         | 30 - 40                                        | 20-30    | + (40)                 |
| S12                            | 129 <sub>II</sub>                 | 2                                         | 90                                             | 0        | + (10)                 |
|                                | 129 <sub>II</sub>                 | 4                                         | 90                                             | 0        | + (10)                 |
|                                | H 18                              | 4                                         | 70                                             | 20       | + (10)                 |
|                                | §) H 18                           | 9                                         | 60                                             | 30       | + (10)                 |
| S13                            | §) 143                            | 2                                         | 30                                             | 60-70    | -                      |
| S14                            | §) 306                            | 4                                         | 60 - 70                                        | 20       | + (>10)                |
| S15                            | §) 146                            | 4                                         | 60 - 70                                        | 20       | + (>10)                |
| S16                            | §) 40                             | 4                                         | >70                                            | 10       | + (<20)                |
|                                | 148                               | 4                                         | 100                                            | 0        | -                      |
| S17                            | nicht<br>getestet                 |                                           |                                                |          |                        |
| S18                            | §) 133 <sub>II</sub>              | 4                                         | 20 - 30                                        | 20-30    | + (50)                 |
|                                | 144                               | 4                                         | 100                                            | 0        | -                      |
| S19                            | §) 172                            | 4                                         | 70 - 80                                        | 10       | + (>10)                |
|                                | 172                               | 10                                        | 40 - 50                                        | 20-30    | + (30)                 |

Fortsetzung: Tabelle 3

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten <sub>30S</sub> | % Restmenge<br>unter 30S-Mono-<br>meren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|------------------------|
| S20                            | §) 191                            | 2                                                    | 20                                             | 20       | + (60)                 |
| S21                            | §) 199                            | 2                                                    | 60 - 70                                        | 20       | + (>10)                |

Die Trennungsprofile der mit ( § ) markierten Versuche sind in Abb. 3 dargestellt. 1 "IgG-Konzentrationseinheit<sub>30S</sub>" entspricht 0,3 OD<sub>280</sub> IgG/1,0 OD<sub>260</sub> 30S.

% größere Aggregate = 100% - (% Restmenge unter Monomeren-Gipfel + % Dimere)  
(Aggregationswerte von <10% sind nicht berücksichtigt.)

H = in Hammel gewonnene Antikörper



Tabelle 4. Effekte von Anti-L1, -L2, ... bis -L34 auf isolierte  
50S Untereinheiten - Quantitative Auswertung der Rohrzucker-Dichte-  
gradientenprofile

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer          | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten 50S | % Restmenge un-<br>ter 50S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| L1                             | 78                                         | 3                                         | 70                                               | 20       | + (10)                 |
|                                | §) 629 <sub>II</sub><br>629 <sup>+</sup> ) | 3<br>100 $\mu$ l <sup>+</sup> )           | 40<br>20                                         | 50<br>30 | + (10)<br>+ (50)       |
| L2                             | 225                                        | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 225 <sup>+</sup> )                         | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 40                                               | <10      | + (>50)                |
|                                | §) 225 <sup>+</sup> )                      | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 30                                               | <<10     | + (<70)                |
|                                | 363 <sup>+</sup> )                         | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 60                                               | <10      | + (>30)                |
| L3                             | 89 <sub>II</sub>                           | 3                                         | 90                                               | 10       | -                      |
|                                | §) 89 <sub>II</sub>                        | 6                                         | 70 - 80                                          | 20-30    | + (<10)                |
|                                | 391                                        | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
| L4                             | §) 178                                     | 3                                         | 80                                               | 10       | + ( 10)                |
| L5                             | §) 70                                      | 3                                         | 70                                               | 20       | + (10)                 |
| L6                             | §) 227                                     | 3                                         | <80                                              | <20      | + (10)                 |
| L7/L12                         | 87 <sub>V</sub>                            | 3                                         | >60                                              | <10      | + (30)                 |
|                                | §) 216                                     | 3                                         | <60                                              | 10       | + (>30)                |
|                                | H 16 <sup>+</sup> )                        | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 40                                               | 0        | + (60)                 |
| L8                             | 386                                        | 3                                         | 90                                               | <10      | -                      |
|                                | §) 386 <sup>+</sup> )                      | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 50 - 60                                          | 0        | + (>40)                |
| L9                             | 388 <sub>I</sub>                           | 3                                         | >90                                              | <10      | -                      |
|                                | §) 388 <sub>II</sub>                       | 3                                         | 70 - 80                                          | <20      | + (10)                 |

Fortsetzung: Tabelle 4

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten $_{50S}$ | % Restmenge un-<br>ter 50S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| L10                            | 69                                | 3                                              | >70                                              | <20      | + (10)                 |
|                                | 266 <sub>II</sub>                 | 3                                              | >90                                              | <10      | -                      |
|                                | §) 351                            | 3                                              | 40                                               | <30      | + (>30)                |
| L11                            | 228                               | 3                                              | >90                                              | <10      | -                      |
|                                | 228 <sup>+) </sup>                | 100 $\mu l^{+)$                                | 60                                               | <<10     | + (>30)                |
|                                | §) 324                            | 3                                              | 70 - 80                                          | >20      | -                      |
| L12                            | s. L7                             |                                                |                                                  |          |                        |
| L13                            | 259                               | 3                                              | 90                                               | <10      | -                      |
|                                | §) 259 <sup>+) </sup>             | 150 $\mu l^{+)$                                | 80 - 90                                          | <<10     | + (10)                 |
| L14                            | §) 294                            | 3                                              | 30 - 40                                          | 20       | + (>40)                |
| L15                            | §) 230                            | 3                                              | 70 - 80                                          | <10      | + (20)                 |
|                                | 295                               | 3                                              | 70                                               | <10      | + (>20)                |
| L16                            | 231                               | 3                                              | 80 - 90                                          | >10      | -                      |
|                                | §) 231                            | 6                                              | 60                                               | 30       | + (10)                 |
|                                | 231                               | 9                                              | 40                                               | 40-50    | + (<20)                |
| L17                            | 76                                | 3                                              | 80 - 90                                          | 10       | -                      |
|                                | 393 <sup>+) </sup>                | 100 $\mu l^{+)$                                | 40                                               | 10       | + (50)                 |
|                                | §) 393 <sup>+) </sup>             | 150 $\mu l^{+)$                                | 30 - 40                                          | 20       | + (<50)                |
| L18                            | §) 260                            | 3                                              | >80                                              | 10       | -                      |
|                                | 261                               | 3                                              | 100                                              | 0        | -                      |

Fortsetzung: Tabelle 4

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten 50S | % Restmenge un-<br>ter 50S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| L19                            | 233                               | 1,5                                       | 60                                               | 20-30    | + (>10)                |
|                                | §) 233                            | 3                                         | 40                                               | 50       | + (10)                 |
|                                | 233                               | 6                                         | 50                                               | 40       | + (10)                 |
|                                | 233 <sup>+) )</sup>               | 100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 30                                               | 10       | + (60)                 |
|                                | 314                               | 3                                         | 50                                               | 50       | -                      |
| L20                            | §) 91                             | 3                                         | 70                                               | 20       | + (10)                 |
|                                | 127 <sub>I</sub>                  | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
| L21                            | 138                               | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | §) 392 <sup>+) )</sup>            | 150 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 80                                               | 10-20    | -                      |
| L22                            | 234                               | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 234 <sup>+) )</sup>               | 100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 70 - 80                                          | 10       | + (>10)                |
|                                | §) 234 <sup>+) )</sup>            | 150 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 70                                               | 20-30    | -                      |
| L23                            | §) 235                            | 3                                         | 30                                               | 20       | + (50)                 |
|                                | 408 <sup>+) )</sup>               | 100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 50                                               | 10       | + (40)                 |
| L24                            | 74                                | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 95 <sub>II</sub>                  | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 293 <sup>+) )</sup>               | 100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | <80                                              | <10      | + (>10)                |
|                                | §) 293 <sup>+) )</sup>            | 150 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 60 - 70                                          | 10-20    | + (20)                 |
| L25                            | 262                               | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 262 <sup>+) )</sup>               | 100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 60                                               | 10       | + (30)                 |
|                                | §) 262 <sup>+) )</sup>            | 150 $\mu$ l <sup>+) )</sup>               | 40 - 50                                          | 20-30    | + (30)                 |
|                                | 315                               | 3                                         | 90                                               | 10       | -                      |

## Fortsetzung: Tabelle 4

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten 50S | % Restmenge un-<br>ter 50S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| L26                            | 409 <sup>+</sup> )                | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 40                                               | 10       | + (50)                 |
|                                | §) 409 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 50                                               | 20       | + (30)                 |
| (S20)                          | 191 <sup>+</sup> )                | 200 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 80                                               | <<10     | + (>10)                |
| L27                            | §) 238                            | 3                                         | 90                                               | 10       | -                      |
|                                | 238                               | 6                                         | 70                                               | <20      | + (>10)                |
|                                | 238                               | 9                                         | >50                                              | 30       | + (>10)                |
| L28                            | 263 <sub>I</sub>                  | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | §) 263 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 80 - 90                                          | <<10     | + (10)                 |
| L29                            | 318                               | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 318 <sup>+</sup> )                | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | >70                                              | <<10     | + (20)                 |
|                                | §) 318 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 50 - 60                                          | 0        | + (>40)                |
| L30                            | 265                               | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | §) 265 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 50 - 60                                          | 30-40    | + ( 10)                |
| L31                            | §) 384 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 50                                               | <10      | + (>40)                |
| L32                            | §) 387 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 70                                               | 0        | + (30)                 |
| L33                            | 218                               | 3                                         | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 218 <sup>+</sup> )                | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 80                                               | 0        | + (20)                 |
|                                | §) 218 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 70 - 80                                          | 0        | + (>20)                |
|                                | 273 <sup>+</sup> )                | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 80                                               | 0        | + (20)                 |
| L34                            | §) 389 <sup>+</sup> )             | 150 $\mu$ l <sup>+</sup> )                | 90                                               | <10      | -                      |

Die Trennungsprofile der mit ( § ) markierten Versuche sind in Abb. 4 dargestellt. 1 "IgG-Konzentrationseinheit<sub>50S</sub>" entspricht 0,3 OD<sub>280</sub> IgG/2,0 OD<sub>260</sub> 50S.

<sup>+</sup>) unfraktioniertes  $\gamma$ -Globulin

H = in Hammel gewonnene Antikörper

Tabelle 5. Konzentrationsverhältnisse zwischen ribosomalen Untereinheiten und IgG-Antikörpern bei den einzelnen Versuchen

|                           | 0,5  | 1    | 1,5  | 2    | 3    | 4    | 4,5  | 6    | 7     | 7,5   | 9     | 10    | IgG-Konz.-<br>einhei-<br>ten <sub>30S</sub> , 50S |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|---------------------------------------------------|
| 1,0 OD <sub>260</sub> 30S |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |                                                   |
| 2,0 OD <sub>260</sub> 50S | 0,15 | 0,3  | 0,45 | 0,6  | 0,9  | 1,2  | 1,35 | 1,8  | 2,1   | 2,25  | 2,7   | 3,0   | OD <sub>280</sub> IgG                             |
| 62,5 µg 30S               | 120  | 240  | 360  | 480  | 720  | 960  | 1080 | 1440 | 1680  | 1800  | 2160  | 2400  | µg IgG                                            |
| 125,0 µg 50S              |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |                                                   |
| 69,5 pMol 30S             | 800  | 1600 | 2400 | 3200 | 4800 | 6400 | 7200 | 9600 | 11200 | 12000 | 14400 | 16000 | pMol IgG                                          |
| 80,5 pMol 50S             |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |                                                   |
| Mol IgG/Mol 30S           | 11   | 22   | 33   | 44   | 66   | 88   | 99   | 132  | 154   | 165   | 198   | 220   |                                                   |
| Mol IgG/Mol 50S           | 10   | 20   | 30   | 40   | 60   | 80   | 90   | 120  | 140   | 150   | 180   | 200   |                                                   |

Bei den Berechnungen wurde berücksichtigt:

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  - Werte (Extinktion einer 1%igen Lösung bei 1 cm Küvetten-Schichtdicke):  
für Ribosomen : 160  
für IgG-Antikörper: 12,5

Molekulargewichte:  
für 30S Untereinheiten:  $0,9 \times 10^6$  Dalton  
für 50S Untereinheiten:  $1,55 \times 10^6$  Dalton  
für IgG-Antikörper :  $1,5 \times 10^5$  Dalton

Die in Reihe 'Mol IgG/Mol Ribosomen' angegebenen Werte sind jeweils auf- oder abgerundet.



## I.2.4. Variabilität der Ribosomen-Antikörper-Reaktion

### I.2.4.1. Reaktionsabhängigkeit von der Antikörperkonzentration

Bei den Experimenten der zuvor beschriebenen Versuchsserien wurde jede Antikörperpräparation bei nur einer Konzentration untersucht. Um Einblick in die Reaktionsabhängigkeit von der Antikörperkonzentration zu bekommen, wurden verschiedene Konzentrationen einer Auswahl von Immunglobulinen getestet (Tabellen 3 u. 4). Die Ribosomenkonzentration war dabei jeweils konstant. Zwischen 0,5 und 10 "IgG-Konzentrationsseinheiten" wurden eingesetzt; das entspricht molaren Verhältnissen von IgGs:Ribosom wie 10-220:1 (Tabelle 5). Von unfractionierten  $\gamma$ -Globulinen wurden Volumina von 100-150  $\mu$ l getestet. Eine Übersicht über alle Konzentrationsversuche bei ausschließlicher Berücksichtigung der Reduktion der Ribosomen-Monomeren-Gipfel gibt Tabelle 6. Einige typische Beispiele werden in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

In niederen Konzentrationsbereichen bewirkte eine Erhöhung der Antikörperkonzentration im allgemeinen eine verstärkte Reduktion des Monomeren-Gipfels (Abb. 5). Der Reduktionsgrad war dabei von der Konzentration linear abhängig (Abb. 6). Bei höheren Konzentrationen erreichten die Reduktionswerte meistens ein Plateau. In einigen Fällen lagen die Werte in einem Optimum und nahmen bei steigender Konzentration wieder ab (Anti-L19, Abb. 5b u. 6, Tabelle 6b; Anti-L26, Tabelle 6b). Dieser Reaktionsverlauf ähnelt jenem bei der quantitativen Präzipitationsreaktion in flüssigem Medium (zur Übersicht s. Heidelberg, 1935).

Einige Antikörper zeigten ein anderes Verhalten (z.B. Anti-S2 und -S3, Tabelle 6a): Bei niedrigen Konzentrationen reagierten die IgGs nicht mit ihren antigenen Proteinen im Ribosom; erst bei höheren Konzentrationen führten sie zu eindeutigen Reaktionseffekten.

Konzentrationserhöhungen der Antikörper bewirkten allerdings nicht in jedem Fall Veränderungen der Ribosomen-Trennungsprofile. Mehrere Antikörper reagierten mit den Ribosomen bei jeder getesteten Konzentration gleich stark (Tabelle 6a u. b). Eine Antikörperpräparation dagegen - Anti-S4 aus Kaninchen  $\gamma_{II}$  - führte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einer Reaktionsantwort. Protein S4, das als isoliertes Protein mit dieser Anti-S4-Aufarbeitung stark reagierte, hat folglich an der Oberfläche der 30S Unter-einheit keine antigenen Determinanten zugänglich, die durch dieses IgG erkannt werden.

Tabelle 6. Reaktionsabhängigkeit von der Antikörperkonzentration

| Antikörper gegen<br>ribosomales Protein | Reduktion der 30S-, 50S- bzw. 70S-Monomeren-<br>Gipfel ("IgG-Konzentrationseinheiten") |                                          |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|                                         | negativ                                                                                | positiv                                  |
| <u>a. 30S</u>                           |                                                                                        |                                          |
| S1                                      |                                                                                        | 2 = 4                                    |
| S2 (147)                                | 1                                                                                      | 4                                        |
| S3                                      | 0,5                                                                                    | 2                                        |
| S4 (67 <sub>II</sub> )                  | 4, 8                                                                                   |                                          |
| (194)                                   |                                                                                        | 4 = 6                                    |
| (H4)                                    |                                                                                        | 4 < 8                                    |
| S5                                      |                                                                                        | 0,5 < 1 < 2                              |
| S8 (362)                                |                                                                                        | 4 < 10                                   |
| S11                                     |                                                                                        | 2 < 4                                    |
| S12 (129 <sub>II</sub> )                |                                                                                        | 2 = 4                                    |
| (H18)                                   |                                                                                        | 4 < 9                                    |
| S19                                     |                                                                                        | 4 < 10                                   |
| <u>b. 50S</u>                           |                                                                                        |                                          |
| L2                                      |                                                                                        | 100 $\mu$ l < 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |
| L3                                      |                                                                                        | 3 < 6                                    |
| L16                                     |                                                                                        | 3 < 6 < 9                                |
| L17 (393)                               |                                                                                        | 100 $\mu$ l = 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |
| L19                                     |                                                                                        | 1,5 < 3 > 6                              |
| L22                                     |                                                                                        | 100 $\mu$ l = 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |
| L24 (293)                               |                                                                                        | 100 $\mu$ l < 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |
| L25 (262)                               |                                                                                        | 100 $\mu$ l < 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |
| L26 (409)                               |                                                                                        | 100 $\mu$ l > 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |
| L27                                     |                                                                                        | 3 < 6 < 9                                |
| L29                                     |                                                                                        | 100 $\mu$ l < 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |
| L33 (218)                               |                                                                                        | 100 $\mu$ l = 150 $\mu$ l <sup>+) </sup> |

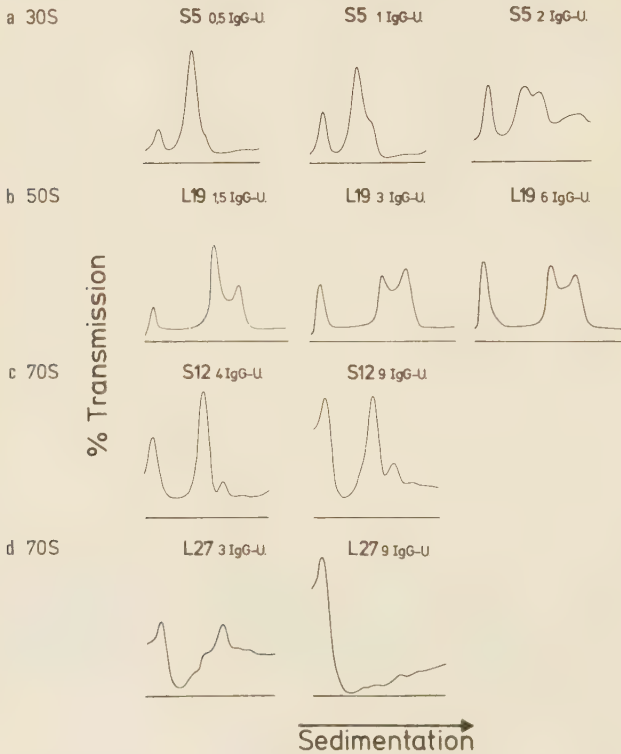
## Fortsetzung: Tabelle 6

| Antikörper gegen<br>ribosomales Protein | Reduktion der 30S-, 50S- bzw. 70S-Monomeren-<br>Gipfel ("IgG-Konzentrations-einheiten") |               |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|                                         | negativ                                                                                 | positiv       |
| <u>c. 70S</u>                           |                                                                                         |               |
| S1                                      |                                                                                         | 2 = 4         |
| S2 (147)                                |                                                                                         | 1 < 4         |
| S3                                      |                                                                                         | 0,5 < 2       |
| S4 (67 <sub>II</sub> )                  | 2                                                                                       | 8             |
| S5                                      |                                                                                         | 0,5 = 1       |
| S11                                     |                                                                                         | 2 < 4         |
| S12 (H18)                               | 4                                                                                       | 9             |
| L5                                      |                                                                                         | 3 < 4,5       |
| L10                                     |                                                                                         | 1,5 < 3 < 7,5 |
| L14                                     |                                                                                         | 3 < 4,5       |
| L16                                     |                                                                                         | 1,5 < 6 < 7,5 |
| L18                                     |                                                                                         | 3 < 4,5       |
| L27                                     |                                                                                         | 3 < 9         |

Die Reduktionen der Ribosomen-Monomeren-Gipfel durch jeweils eine Antikörperpräparation sind in Abhängigkeit der verwendeten "IgG-Konzentrations-einheiten" verglichen. Versuche mit unfraktioniertem  $\gamma$ -Globulin sind durch ( + ) markiert. Reduktionsergebnisse mit wenigstens 10% Differenz wurden als unterschiedlich angesehen. Die aufgeführten Resultate sind den Tabellen 3 (30S), 4 (50S) sowie 10 und 11 (70S) entnommen. Für einige Antikörper sind die Nummern der immunisierten Tiere angegeben.

- Versuchsserie mit isolierten 30S Untereinheiten
- Versuchsserie mit isolierten 50S Untereinheiten
- Versuchsserie mit undissoziierten 70S Ribosomen

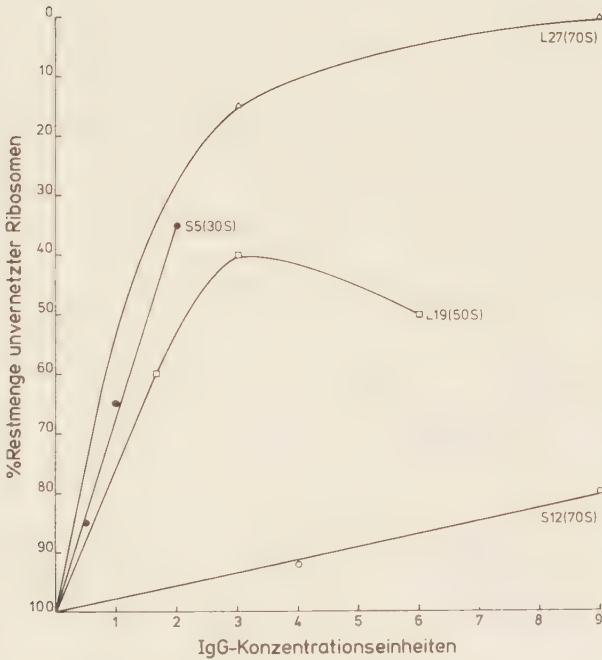
Abb. 5. Reaktionsabhängigkeit von der Antikörperkonzentration



Die einzelnen Effekte sind in den Tabellen 3, 4, 10 und 11 quantitativ aufgeführt.

IgG-U = IgG-Konzentrationseinheit(en)

Abb. 6. Reduktion des Ribosomen-Monomeren-Gipfels in Abhängigkeit der Antikörperkonzentration



Die Sedimentationsprofile in Abb. 5 und die in den Tabellen 3, 4, 10 und 11 aufgeführten Reduktionswerte sind zugrunde gelegt.

#### I.2.4.2. Abhängigkeit der Ribosomen-Antikörper-Reaktion von der individual-spezifischen Immunantwort der Tiere

Da bekannt ist, daß ein und dasselbe Immunogen in verschiedenen Tieren sowohl einer Spezies als auch verschiedener Arten zu unterschiedlichen Immunantworten führen kann (zur Übersicht s. Eisen, 1973; s. auch Abschnitt 5. der Einleitung), wurden für die einzelproteinspezifischen Antikörper in Abhängigkeit der Individualspezifität abweichende Reaktivitäten erwartet. Ribosomen und Antikörper, die gegen ein und dasselbe Protein in verschiedenen Kaninchen bzw. Kaninchen oder Schafen gewonnen waren, wurden unter jeweils gleichen Konzentrationsbedingungen inkubiert. Die folgenden Reaktionstypen wurden beobachtet (Tabelle 7a u. b): 1. Antikörper aus verschiedenen Tieren führten in einigen Fällen zu gleichen Reaktionsantworten. 2. Je nach Tierursprung reagierten die Antikörperpräparationen mit ihren entsprechenden Proteinen im Ribosom nicht oder unterschiedlich stark. Zwei Beispiele für diesen zweiten Typ werden besprochen.

Von drei Anti-L10-Präparationen mit jeweils gleichen Präzipitationstern, aber aus verschiedenen Kaninchen, reagierte eine nicht mit 50S Untereinheiten. Die anderen beiden Aufarbeitungen zeigten dagegen sehr starke, aber unterschiedliche Reaktionen (Tabelle 7b u. Abb. 7). Alle drei Anti-L10-Präparationen enthielten demnach, wohl aufgrund individualspezifischer Immunantworten der Tiere, Antikörperpopulationen mit unterschiedlichen Spezifitäten.

Vergleichbare Effekte wurden mit drei Anti-S4-Aufarbeitungen nachgewiesen, die gleiche Titer hatten und in Kaninchen oder Schafen gewonnen waren (Tabelle 7a). Anti-S4 aus Kaninchen 67<sub>II</sub> reagierte - wie bereits erwähnt - nicht mit 30S Untereinheiten. Die beiden Anti-S4-Präparationen aus Kaninchen 194 bzw. Hammel 4 führten dagegen zu sehr starken, jedoch ungleichen Reaktionen; die Kaninchen-IgGs reagierten etwas schwächer als die Schafantikörper.

Eine Variabilität der Antigenspezifität war nicht nur für Antikörper aus verschiedenen Tieren zu beobachten. So konnte für Anti-L9 aus einem Kaninchen demonstriert werden, daß in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Applikation des Immunogens die Spezifität der Antikörperpopulation verändert war. Die IgG-Präparation derjenigen Serumabnahme, die nach der dritten Injektion von L9 erfolgte (388<sub>I</sub>), führte zu keiner Reaktionsantwort mit 50S Untereinheiten, während die Aufarbeitung der Serumabnahme nach der sechsten Injektion (388<sub>II</sub>) eindeutig reagierte (Tabelle 7b).



Tabelle 7. Abhängigkeit der Ribosomen-Antikörper-Reaktion von der individualspezifischen Immunantwort der einzelnen Tiere

| Antikörper gegen<br>ribosomales Protein | Reduktion der 30S-, 50S- bzw. 70S-Monomeren-<br>Gipfel durch verschiedene Antikörperpräpara-<br>tionen (Tier-Nr.) |                             |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                         | negativ                                                                                                           | positiv                     |
| <u>a. 30S</u>                           |                                                                                                                   |                             |
| S2                                      |                                                                                                                   | 65 < 147 = 307              |
| S4                                      | 67 <sub>II</sub>                                                                                                  | 194 < H4                    |
| S8                                      |                                                                                                                   | 362 < 77                    |
| S12                                     |                                                                                                                   | 129 <sub>II</sub> < H18     |
| S16                                     | 148                                                                                                               | 40                          |
| S18                                     | 144                                                                                                               | 133 <sub>II</sub>           |
| <u>b. 50S</u>                           |                                                                                                                   |                             |
| L1                                      |                                                                                                                   | 78 < 629 <sub>II</sub>      |
| L2                                      |                                                                                                                   | 363 < 225                   |
| L3                                      | 391                                                                                                               | 89 <sub>II</sub>            |
| L7 / L12                                |                                                                                                                   | 87 <sub>V</sub> < 216 < H16 |
| L9                                      | 388 <sub>I</sub>                                                                                                  | 388 <sub>II</sub>           |
| L10                                     | 266 <sub>II</sub>                                                                                                 | 69 < 351                    |
| L11                                     | 228                                                                                                               | 324                         |
| L15                                     |                                                                                                                   | 230 = 295                   |
| L18                                     | 261                                                                                                               | 260                         |
| L19                                     |                                                                                                                   | 314 < 233                   |
| L20                                     | 127 <sub>I</sub>                                                                                                  | 91                          |
| L24                                     | 74, 95 <sub>II</sub>                                                                                              |                             |
| L25                                     | 262                                                                                                               | 315                         |
| L33                                     |                                                                                                                   | 218 = 273                   |

Fortsetzung: Tabelle 7

| Antikörper gegen<br>ribosomales Protein | Reduktion der 30S-, 50S- bzw. 70S-Monomeren-<br>Gipfel durch verschiedene Antikörperpräpara-<br>tionen (Tier-Nr.) |                         |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|                                         | negativ                                                                                                           | positiv                 |
| c. 70S                                  |                                                                                                                   |                         |
| S2                                      |                                                                                                                   | 147 < 307               |
| S4                                      |                                                                                                                   | 194 = H4                |
| S8                                      |                                                                                                                   | 77 = 362                |
| S16                                     |                                                                                                                   | 40 = 148                |
| S18                                     |                                                                                                                   | 144 < 133 <sub>II</sub> |
| L7/L12                                  |                                                                                                                   | 87 <sub>V</sub> < 216   |
| L19                                     | 233, 314                                                                                                          |                         |
| L33                                     |                                                                                                                   | 273 < 218               |

Die Reduktionen der Ribosomen-Monomeren-Gipfel sind in Abhängigkeit der verwendeten Antikörper verglichen (für Einzelheiten s. Tabellen 3, 4, 10 und 11). Die aufgeführten Zahlen geben den Tierursprung an. Die in einigen Fällen benutzten Schafantikörper sind zur Unterscheidung von den Kaninchenantikörpern mit H (= Hammel) gekennzeichnet. Die Reduktionsergebnisse verschiedener Antikörper gegen jeweils ein ribosomales Protein beziehen sich stets auf gleiche Antikörperkonzentrationen. Es sind jeweils nur Versuche mit isolierten IgGs bzw. unfraktionierten  $\gamma$ -Globulin-Präparationen miteinander verglichen. Resultate mit wenigstens 10% Differenz wurden als unterschiedlich angesehen.

- Versuchsserie mit isolierten 30S Untereinheiten
- Versuchsserie mit isolierten 50S Untereinheiten
- Versuchsserie mit undissoziierten 70S Ribosomen

#### I.2.4.3. Verwendung von unfractioniertem $\gamma$ -Globulin

Unfraktionierte  $\gamma$ -Globuline, also Immunglobulingemische, die im wesentlichen IgG-, IgM- und IgA-Antikörper enthalten, und reine IgG-Antikörper aus jeweils denselben proteinspezifischen Antiseren wurden vergleichsweise mit ribosomalen Untereinheiten inkubiert. Es sollte festgestellt werden, ob  $\gamma$ -Globuline zu anderen Reaktionseffekten führen als IgGs allein.

$\gamma$ -Globuline zeigten generell stärkere Reaktionen mit Untereinheiten als reine IgGs. So reagierten  $\gamma$ -Globuline der Antiseren gegen L1 oder L19 mit SOS Subpartikeln stärker als die entsprechenden IgGs aus denselben Seren (Tabelle 4). Dieser Effekt sollte auf folgendes zurückzuführen sein: 1. Im Falle von Anti-L1 dürfte die IgG-Konzentration beim Test mit 100  $\mu$ l  $\gamma$ -Globulin höher sein als bei der Inkubation mit 3 "Konzentrationseinheiten" isolierten IgGs: 100  $\mu$ l  $\gamma$ -Globulin enthalten durchschnittlich 1250  $\mu$ g IgG, die 5,2 "IgG-Konzentrationseinheiten" entsprechen würden (s. Tabelle 5). 2. Die stärkeren Reaktionen mit  $\gamma$ -Globulin könnten aber auch - wie bereits oben erwähnt - durch die zusätzliche Anwesenheit von proteinspezifischen IgM- und IgA-Antikörpern bedingt sein. Diese Erklärung sollte vornehmlich für die Ergebnisse mit Anti-L19 zutreffen: Hier wiesen  $\gamma$ -Globulin- und IgG-Präparationen etwa gleiche IgG-Konzentrationen auf, jedoch bewirkte das  $\gamma$ -Globulin im Vergleich zum IgG neben wesentlich stärkerer Reduktion des SOS-Monomerengipfels vermehrte Bildung von höhervernetzten Ribosomen-Antikörper-Aggregaten (Tabelle 4). Der hohe Vernetzungsgrad dürfte auf der Multivalenz der IgM-Antikörper und der Aggregate der IgA-Antikörper beruhen (s. Abschnitt I.2.3.).

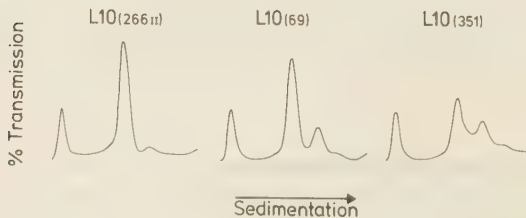
Die folgenden Antikörper reagierten nicht bzw. nur schwach mit SOS Untereinheiten, wenn IgG-Präparationen getestet wurden, jedoch stark bei der Verwendung von  $\gamma$ -Globulin: Anti-L2, -L8, -L11, -L13, -L22, -L25, -L28, -L29, -L30 und -L33 (s. Tabelle 4).

Die unterschiedlichen Reaktionseigenschaften der  $\gamma$ -Globuline und reinen IgGs wurden erwartet. Die untersuchten IgGs waren allesamt Präparationen, die in Immuno-Diffusionsversuchen nur sehr geringe oder keine Titer gegen die jeweiligen isolierten Einzelproteine aufwiesen. Die entsprechenden Antiseren waren ausnahmslos sogenannte "frühe" Seren aus Kaninchen. Es ist bekannt, daß während der frühen Immunisierungsperiode vornehmlich IgM-Antikörper gebildet werden (Uhr und Finkelstein, 1967). Spezifische IgGs treten erst nach den IgMs auf.

#### I.2.4.4. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Der Grad der Ribosomen-Antikörper-Reaktion ist in mehrfacher Hinsicht von der Antikörperpräparation abhängig. Durch Veränderung der Antikörperkonzentration und Ausnutzung der individualspezifischen Zusammensetzung der Antikörperpräparationen sowie durch Verwendung von  $\gamma$ -Globulin anstatt reinem IgG war für mehrere Proteine im intakten Ribosom eine Variabilität der Reaktionsgrade zwischen "nicht reaktiv" und "stark reaktiv" nachzuweisen. Aus diesen Befunden ist zu folgern: 1. Die quantitativ abgeschätzten Reaktionsgrade der einzelnen Proteine mit ihren Antikörpern geben keine Hinweise auf den Grad der Exponiertheit der Proteine an der Ribosomenoberfläche. 2. Aus der "Nicht-Reaktivität" von Antikörpern mit ribosomalen Proteinen in situ läßt sich nicht schließen, daß die Proteine unerreichbar und folglich im Ribosomeninneren gelegen sind.

Abb. 7. Beispiel für individualspezifische Immunantworten gegen ein und dasselbe Immunogen (Protein L10)



Die Vernetzungseffekte der drei Anti-L10-Präparationen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Weiteres s. im Text.

### I.2.5. Inkubation von dissoziierten, radioaktiv markierten Ribosomen mit Antikörpern

Bei den zuvor beschriebenen Versuchen ließen sich die verschiedenen Effekte, die proteinspezifische Antikörper hervorrufen, quantitativ lediglich abschätzen. Um zu demonstrieren, daß die Transmissionsmessungen überschlägige quantitative Auswertungen erlaubten, wurden in Vorversuchen radioaktiv markierte Ribosomen mit Antikörpern gegen Proteine der 30S Untereinheit inkubiert und die Inkubationsgemische auf Dichtegradienten aufgetrennt (s. "Materialien und Methoden" und Stöffler, Hasenbank, Lütgehaus, Maschler, Morrison, Zeichhardt und Garrett, 1973). Die Bestimmung der Konzentrationen der Ribosomen und Ribosomen-Antikörper-Komplexe unter den einzelnen Trennungsgipfeln erfolgte sowohl photometrisch, wie in "Materialien und Methoden" (Abschnitt 7.4.4.) beschrieben, als auch durch Messung der Radioaktivität. Es zeigte sich, daß die mit beiden Methoden ermittelten Konzentrationswerte um nicht mehr als  $\pm 15\%$  voneinander abwichen. Aufgrund der guten Übereinstimmung wurde bei allen übrigen Versuchsserien der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung radioaktiv markierter Ribosomen zur quantitativen Auswertung der Trennungsprofile verzichtet.

- Bei allen Experimenten wurden in Untereinheiten dissoziierte  $^3\text{H}$ -Ribosomen mit Antikörpern inkubiert. Typische Effekte auf das Sedimentationsverhalten der Ribosomen werden in Abbildung 8 gezeigt (für eine Übersicht über alle Ergebnisse s. Tabelle 8). Die Untersuchungen ergaben ebenso wie die Studien mit isolierten Untereinheiten, daß alle Proteine an der Oberfläche der 30S Subpartikel für Antikörper zugänglich sind. Lediglich die Daten für Protein S4 lagen an der Grenze der Signifikanz. Mit Anti-S4-Präparationen, die in anderen Tieren gewonnen waren, konnten jedoch bereits eindeutig positive Resultate beobachtet werden (s. I.2.4.2.).

Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine Reaktionsabhängigkeit von der individualspezifischen Immunantwort der Tiere (Anti-S7 und -S8; Tabelle 8) und der Antikörperkonzentration (z.B. Anti-S12) beobachtet. Nur in zwei Fällen trat eine komplette Reduktion des 30S-Gipfels auf (Anti-S9 und -S12). Alle übrigen Antikörper reagierten selbst bei den höchsten IgG-Konzentrationen lediglich partiell. Die Reduktionswerte erreichten dabei stets ein Plateau (Tabelle 8).

Der 50S-Monomeren-Gipfel war bei keinem Versuch im Vergleich zu Kontrollmustern stark erhöht oder verbreitert. Größere Mengen von 30S-IgG-30S-Komplexen, die mit einem Sedimentationswert von ca. 45S in unmittelbarer Nähe

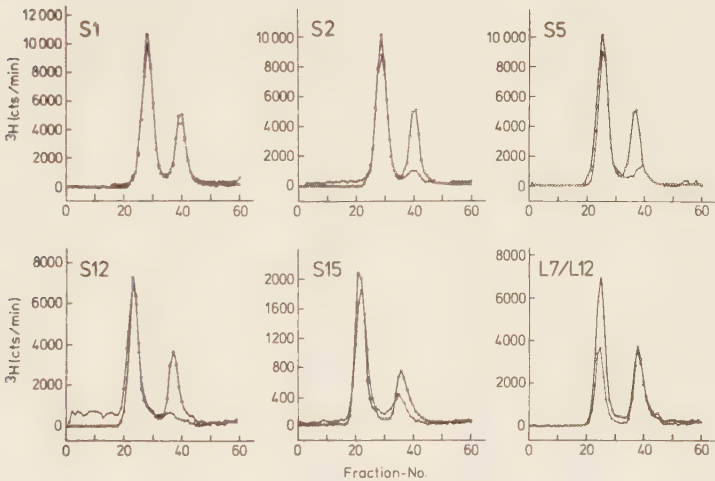
der 50S Subpartikel hätten auftreten müssen, wurden in diesem System folglich nicht nachgewiesen. Dieser Befund ist mit den Ergebnissen aus der Versuchsserie mit isolierten 30S Untereinheiten nicht in Einklang zu bringen, traten doch bei jenen Experimenten in der Regel Dimere auf. Dieser Effekt soll später ausführlich diskutiert werden (s. Abschnitt I.3.3.).

Inkubation mit Anti-S6, -S7, -S8, -S9, -S12, -S14, -S19, -S20 und -S21 führte zur Bildung von 30S-Antikörper-Komplexen, die schneller als 50S Untereinheiten sedimentierten. In allen Fällen war die Menge der Aggregate im Vergleich zum 30S-Monomeren-Gipfel unbehandelter Ribosomen sehr gering. Bei Inkubation mit Anti-S5 oder Anti-S11 wurde in geringem Maße langsam sedimentierendes Material von 8S und 16S nachgewiesen.

Die Experimente mit dissoziierten  $^3\text{H}$ -Ribosomen, bei denen also 30S Untereinheiten in Gegenwart von 50S Subpartikeln mit Antikörpern inkubiert wurden, ergaben außer den Ergebnissen zur Erreichbarkeit der Proteine in intakten 30S Untereinheiten weitere unabhängige Aussagen: Es ließen sich die Effekte von Antikörpern gegen 30S-Einzelproteine auf das Sedimentationsverhalten von 50S Untereinheiten bestimmen (Morrison, Garrett, Zeichhardt und Stöffler, 1973). IgGs gegen 13 der 30S-Proteine bewirkten keinerlei Verminderung des 50S-Monomeren-Gipfels, enthielten also keine Antikörper, die unter den gewählten Versuchsbedingungen 50S Untereinheiten vernetzten (Tabelle 9). Umgekehrt hatten auch IgGs gegen 50S-Proteine keinen Effekt auf den 30S-Gipfel (z.B. Anti-L7/L12; Abb. 8). Dagegen bewirkten Antikörperpräparationen gegen 8 verschiedene Proteine der 30S Subpartikel zusätzlich zur Reduktion des 30S-Gipfels eine Verminderung des Anteils an 50S Untereinheiten (Anti-S9, -S11, -S12, -S14, -S16, -S19, -S20 und -S21; Tabelle 9). Die einfachste Interpretation ist, daß die betreffenden Proteine sowohl in 30S als auch in 50S Untereinheiten vorliegen. Solche Proteine könnten im Untereinheiten-Grenzbereich von 70S Ribosomen oder dessen Umgebung vorkommen und bei der Dissoziation des Ribosoms in Untereinheiten auf beide Subpartikel verteilt werden. Eine Ausnahme könnte jedoch für Protein S20 gelten: Dieses 30S-Protein ist mit Protein L26 der 50S Untereinheit identisch (Wittmann et al., 1974; Tischendorf, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse). In der Tat ergaben Untersuchungen des Grenzbereiches, daß fast alle der zuvor aufgeführten Proteine Komponenten dieser Region sein dürften (s. Abschnitt 1.1. der Schlußdiskussion).



Abb. 8. Rohrucker-Dichtegradienten - Antikörpereffekte auf die 30S Untereinheiten dissoziierter Ribosomen



Repräsentative Sedimentationsprofile von dissoziierten  $^3\text{H}$ -Ribosomen, die mit IgGs gegen 30S-Einzelproteine vorinkubiert wurden, sind ausgewählt (●—●). Die Trennungsprofile unbehandelter Ribosomen sind jeweils überlagert (o—o). Jeweils 1 "IgG-Konzentrationseinheit" (= 0,3 OD<sub>280</sub> IgG/3,0 OD<sub>260</sub> 70S) Anti-S1, -S2 und -S5 bzw. 4 "Einheiten" Anti-S12 und -S15 wurden mit 3,0 OD<sub>260</sub> dissoziierten 70S Ribosomen inkubiert (s. "Materialien und Methoden"). Ein Effekt auf den 30S-Gipfel wurde bei Inkubation mit 4 "Einheiten" Anti-L7/L12 nicht beobachtet. (Irrtümlicherweise wurde in der angegebenen Veröffentlichung 1 OD<sub>280</sub> IgG/3,0 OD<sub>260</sub> 70S als 1 "IgG-Konzentrationseinheit" angegeben.) (aus Stöffler, Hasenbank, Lütgehaus, Maschler, Morrison, Zeichhardt und Garrett, 1973)

Tabelle 8. Quantitative Auswertung der Antikörpereffekte auf die 30S Untereinheiten dissoziierter Ribosomen

| IgG<br>against<br>protein | IgG<br>from<br>rabbit<br>number | IgG<br>concentration<br>units tested | Area under 30S<br>peak reduced to<br>per cent of<br>control | Percentage of<br>subunits preci-<br>pitated at<br>plateau region |
|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| S1                        | 221                             | 1, 2, 4 <sup>a</sup>                 | 88, 73, 64 <sup>a</sup>                                     | 27                                                               |
| S2                        | 147                             | 1                                    | 37                                                          | 63                                                               |
| S3                        | 123                             | 1                                    | 58                                                          | 42                                                               |
| S4                        | 67 <sub>II</sub>                | 2, 4                                 | 94, 95                                                      | 6                                                                |
|                           | 128                             | 2, 4                                 | 98, 96                                                      | 4                                                                |
| S5                        | 113                             | 1                                    | 36                                                          | 64                                                               |
| S6                        | 114                             | 2, 4                                 | 77, 49                                                      | 51                                                               |
| S7                        | 125                             | 2, 4                                 | 76, 37                                                      | 63                                                               |
|                           | 137                             | 2, 4                                 | 99, 83                                                      | 17                                                               |
| S8                        | 77                              | 1, 2, 4                              | 90, 92, 80                                                  | 20                                                               |
|                           | 111                             | 1, 2, 4, 6                           | 84, 73, 70, 73                                              | 28                                                               |
| S9                        | 132                             | 1                                    | 0                                                           | 100                                                              |
| S10                       | 173                             | 2, 4                                 | 92, 75                                                      | 25                                                               |
| S11                       | 222                             | 1, 2, 4                              | 80, 80, 79                                                  | 20                                                               |
| S12                       | 129 <sub>II</sub>               | 1, 2, 4                              | 43, 25, 0                                                   | 100                                                              |
| S13                       | 143                             | 1                                    | 72                                                          | 28                                                               |
| S14                       | 160                             | 2, 4                                 | 68, 57                                                      | 43                                                               |
| S15                       | 146                             | 2, 4                                 | 74, 62                                                      | 38                                                               |
| S16                       | 148                             | 2, 4                                 | 87, 67                                                      | 33                                                               |
| S17                       | 130                             | 2, 4                                 | 65, 61                                                      | 39                                                               |
| S18                       | 144                             | 2, 4                                 | 88, 85                                                      | 15                                                               |
| S19                       | 149                             | 1, 2, 4                              | 86, 77, 62                                                  | 38                                                               |
| S20                       | 134 <sub>II</sub>               | 2, 4                                 | 44, 26                                                      | 74                                                               |
| S21                       | 135                             | 1, 2, 4                              | 60, 56, 40                                                  | 60                                                               |

<sup>a</sup> Bestimmung mit Ribosomen durchgeführt, die nicht bei 0,5 M NH<sub>4</sub>Cl gewaschen wurden.

(aus Stöffler, Hasenbank, Lütgehaus, Maschler, Morrison, Zeichhardt und Garrett, 1973)

Tabelle 9. Quantitative Auswertung der Effekte von Antikörpern gegen 30S-Proteine auf die 50S Untereinheit dissoziierter Ribosomen

| IgG's specific<br>for protein | IgG's from<br>rabbit number | IgG concen-<br>tration units | Maximum percen-<br>tage reduction in 50S<br>subunit peak |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------|
| S1                            | 221                         | 1,2,4                        | 0                                                        |
| S2                            | 147                         | 1                            | 0                                                        |
| S3                            | 123                         | 1                            | 0                                                        |
| S4                            | 67                          | 2,4                          | 0                                                        |
|                               | 128                         | 2,4                          | 0                                                        |
| S5                            | 113                         | 1                            | 0                                                        |
| S6                            | 114                         | 2,4                          | 0                                                        |
| S7                            | 125                         | 2,4                          | 0                                                        |
|                               | 137                         | 2,4                          | 0                                                        |
| S8                            | 77                          | 2,4                          | 0                                                        |
|                               | 111                         | 1,2,4                        | 0                                                        |
| S9                            | 132                         | 1                            | 22                                                       |
| S10                           | 173                         | 2,4                          | 0                                                        |
| S11                           | 222                         | 2,4,6                        | 20                                                       |
| S12                           | 129                         | 2,4                          | 24                                                       |
| S13                           | 143                         | 1                            | 0                                                        |
| S14                           | 160                         | 2,4                          | 10                                                       |
| S15                           | 146                         | 2,4                          | 0                                                        |
| S16                           | 148                         | 2,4                          | 23                                                       |
| S17                           | 130                         | 2,4                          | 0                                                        |
| S18                           | 144                         | 2,4                          | 0                                                        |
| S19                           | 149                         | 1,2,4                        | 33                                                       |
| S20                           | 134                         | 2,4                          | 49                                                       |
| S21                           | 135                         | 1,2,4                        | 24                                                       |

(aus Morrison, Garrett, Zeichhardt und Stöffler, 1973)

### I.2.6. Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter 70S Ribosomen

Es wurde die Frage untersucht, ob die ribosomalen Proteine an der Oberfläche undissoziierter 70S Ribosomen in gleichem Maße für Antikörper erreichbar sind wie in isolierten Untereinheiten. Es wurde erwartet, daß einige in Untereinheiten zugängliche Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich der 70S Ribosomen mit ihren Antikörperbindungsstellen teilweise oder vollkommen verdeckt sind. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Erreichbarkeit der Proteine in 70S Ribosomen in nahezu gleicher Weise wie bei den Versuchen mit isolierten Untereinheiten ermittelt (s. "Materialien und Methoden") und anschließend ein Vergleich zwischen der Proteinzugänglichkeit in beiden Systemen angestellt.

#### I.2.6.1. Zugänglichkeit ribosomaler Proteine in undissoziierten 70S Ribosomen

Für diese Untersuchungen wurden aus der Serie der schon verwendeten Antikörper 27 Antikörperpräparationen gegen die Einzelproteine der 30S Untereinheit und 38 Präparationen gegen die 50S-Proteine ausgewählt und bei entsprechenden Antigen-Antikörper-Konzentrationsverhältnissen mit 70S Ribosomen inkubiert wie bei den Studien mit isolierten Subpartikeln (Tabellen 10-12, vergleiche mit Tabellen 3-5). Die Sedimentationsprofile, von denen typische Beispiele in den Abbildungen 9 und 10 gezeigt sind, wurden quantitativ ausgewertet, wie in "Materialien und Methoden" (Abschnitt 7.4.4.) beschrieben.

#### Inkubation von 70S Ribosomen mit Anti-S1, -S2, ... bis -S21<sup>+</sup>)

Bereits semiquantitative Auswertungen der einzelnen Trennungsmuster ergaben, daß jeder Antikörper gegen eins der zwanzig untersuchten 30S-Proteine mit seinem entsprechenden Protein auch im intakten 70S Ribosom reagierte (Abb. 9 u. Tabelle 13). Etwa die Hälfte aller Antikörperpräparationen führte jeweils zu starker bis mittlerer Reduktion des 70S Ribosomen-Gipfels. Anti-S20 hatte den weitaus stärksten Effekt und führte zum völligen Verschwinden des 70S-Monomeren-Gipfels. Die übrigen Antikörper riefen schwache, aber signifikante Verminderungen des 70S-Gipfels hervor.

Antikörper gegen zwölf Einzelproteine der 30S Untereinheit bewirkten die abschließliche Bildung von 70S-IgG-70S-Komplexen. Diese Dimere sedimentierten mit ca. 100S. Dimere und höhervernetzte Aggregate wurden von Antikörpern gegen sieben andere Proteine gebildet. Nach Inkubation von 70S Ribosomen mit Anti-S8 waren nur höhervernetzte Aggregate nachzuweisen.

---

<sup>+</sup>) Anti-S17 wurde nicht getestet.

Vier Antikörperpräparationen (Anti-S2, -S9, -S10 und -S20) führten zu einer teilweisen Dissoziation der 70S Ribosomen in Untereinheiten: In einer Schulter jeweils vor dem 70S-Gipfel trat Material auf, das wie ungenügend voneinander getrennte 30S und 50S Untereinheiten sedimentierte (Abb. 9).

#### Inkubation von 70S Ribosomen mit Anti-L1, -L2, ... bis -L34

Fast alle Proteine der 50S Untereinheit sind auch in undissoziierten 70S Ribosomen für ihre spezifischen Antikörper erreichbar (Abb. 10 u. Tabelle 14). Antikörper gegen die Mehrzahl der 50S-Einzelproteine reduzierten in teilweise unterschiedlichem Maße den 70S-Gipfel. 22 Antikörperpräparationen führten sowohl zur Bildung von Dimeren als auch zu höhervernetzten 70S-Antikörper-Komplexen (Abb. 10 u. Tabelle 14). In den meisten Fällen überwog dabei der Anteil an Dimeren. Antikörper gegen 8 50S-Proteine verknüpften die Ribosomen ausschließlich zu Dimeren. Immunglobuline gegen zwei Proteine bildeten nur größere Aggregate.

Lediglich die Antikörper gegen L19, die mit reinen 50S Untereinheiten äußerst stark reagierten (s. Abb. 4, Tabellen 2 u. 4), hatten auf 70S Ribosomen keinerlei Effekt; der 70S-Monomeren-Gipfel wurde durch zwei Anti-L19-Präparationen aus verschiedenen Tieren nicht reduziert (Abb. 10, Tabellen 11 u. 14). Die Antikörperbindungsstellen von Protein L19, die in isolierten 50S Untereinheiten zugänglich sind, liegen demnach in 70S Ribosomen vollkommen verdeckt vor. Es kann also angenommen werden, daß die Bindungsstellen dieses Proteins durch die Assoziation von 50S Untereinheiten mit 30S Subpartikeln direkt blockiert werden; d.h. L19 ist im Untereinheiten-Grenzbereich von 70S Ribosomen gelegen. Durch Ergebnisse unabhängiger Untersuchungen wird das bestätigt (s. Abschnitt 1.1. der Schlußdiskussion).

Anti-L27 bewirkte als einziger Antikörper gegen 50S-Proteine eine Dissoziation der 70S Ribosomen in Untereinheiten. Die Schulter vor dem 70S-Monomeren-Gipfel repräsentiert unter diesen Separationsbedingungen Partikel, die etwa mit 30-50S sedimentieren (Abb. 10).

#### Erhöhung der Antikörperkonzentration und Verwendung von Antikörpern aus verschiedenen Tieren

Die Reaktion von Immunglobulinen mit 70S Ribosomen war wie bei den Studien mit isolierten Untereinheiten abhängig von der Antikörperkonzentration (für typische Beispiele s. Abb. 5 u. 6) und der individualspezifischen Immunantwort der Tiere. Die einzelnen Effekte sind bereits ausführlich für

Tabelle 10. Effekte von Anti-S1, -S2, ... bis -S21 auf undissoziierte 70S Ribosomen - Quantitative Auswertung der Rohrzucker-Dichtegradientenprofile

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten <sub>70S</sub> | % Restmenge un-<br>ter 70S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| S1                             | 221 <sub>II</sub>                 | 2                                                    | 70 - 80                                          | 10 - 20  | + (10)                 |
|                                | §) 221 <sub>II</sub>              | 4                                                    | 70                                               | 20       | + (10)                 |
| S2                             | 147                               | 1                                                    | 70 - 80                                          | 20       | -                      |
|                                | §) 147                            | 4                                                    | 40 - 50                                          | >50      | -                      |
|                                | 307                               | 4                                                    | 30 - 40                                          | 50 - 60  | + (10)                 |
| S3                             | 123 <sub>II</sub>                 | 0,5                                                  | 80 - 90                                          | 10       | -                      |
|                                | §) 123 <sub>II</sub>              | 2                                                    | 70 - 80                                          | 20 - 30  | -                      |
| S4                             | 67 <sub>II</sub>                  | 2                                                    | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 67 <sub>II</sub>                  | 8                                                    | 90                                               | 10       | -                      |
|                                | 194                               | 4                                                    | 70 - 80                                          | 20 - 30  | -                      |
|                                | §) H4                             | 4                                                    | 70                                               | 30       | -                      |
| S5                             | 113                               | 0,5                                                  | 80 - 90                                          | <20      | -                      |
|                                | §) 113                            | 1                                                    | 80                                               | 20       | -                      |
| S6                             | §) 114                            | 4                                                    | 70                                               | 30       | -                      |
| S7                             | §) 125 <sub>II</sub>              | 4                                                    | 70 - 80                                          | <30      | -                      |
| S8                             | §) 77                             | 4                                                    | 90                                               | 0        | + (10)                 |
|                                | 362                               | 4                                                    | 90                                               | 10       | -                      |
| S9                             | §) 132 <sub>II</sub>              | 1                                                    | 40 - 50                                          | 30       | + ( 20)                |
| S10                            | §) 173 <sub>II</sub>              | 4                                                    | 20                                               | 60 - 70  | + (10)                 |
| S11                            | 222 <sub>III</sub>                | 2                                                    | 50 - 60                                          | 30       | + ( > 10)              |
|                                | §) 222 <sub>III</sub>             | 4                                                    | 30                                               | 20 - 30  | + ( > 40)              |



## Fortsetzung: Tabelle 10

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten 70S | % Restmenge<br>unter 70S-Mono-<br>meren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|------------------------|
| S12                            | 129 <sub>II</sub>                 | 2                                         | 100                                            | 0        | -                      |
|                                | H18                               | 4                                         | >90                                            | <10      | -                      |
|                                | §) H18                            | 9                                         | 80                                             | 20       | -                      |
| S13                            | §) 143                            | 2                                         | 50                                             | 40-50    | -                      |
| S14                            | §) 306                            | 4                                         | 80 - 90                                        | <20      | -                      |
| S15                            | §) 146                            | 4                                         | 80 - 90                                        | <20      | -                      |
| S16                            | §) 40                             | 4                                         | 80 - 90                                        | 10-20    | -                      |
|                                | 148                               | 4                                         | 80 - 90                                        | 10-20    | -                      |
| S17                            | nicht<br>getestet                 |                                           |                                                |          |                        |
| S18                            | §) 133 <sub>II</sub>              | 4                                         | <40                                            | 50-60    | + (10)                 |
|                                | 144                               | 4                                         | 90                                             | 10       | -                      |
| S19                            | §) 172                            | 4                                         | <90                                            | 10-20    | -                      |
| S20                            | §) 191                            | 2                                         | 0                                              | 10       | + <90                  |
| S21                            | §) 199                            | 2                                         | 50 - 60                                        | 20-30    | + (20)                 |

Die Trennungsprofile der mit ( § ) markierten Versuche sind in Abb. 9 dargestellt. 1 "IgG-Konzentrationseinheit<sub>70S</sub>" entspricht 0,2 OD<sub>280</sub> IgG/2,0 OD<sub>260</sub> 70S. Für weitere Einzelheiten s. Legende zu Tabelle 3.

H = in Hammel gewonnene Antikörper

Tabelle 11. Effekte von Anti-L1, -L2, ... bis -L34 auf undissoziierte 70S Ribosomen - Quantitative Auswertung der Rohrzucker-Dichtegradienten-profile

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten <sub>70S</sub> | % Restmenge un-<br>ter 70S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| L1                             | §) 629 <sub>II</sub>              | 3                                                    | 40 - 50                                          | 40 - 50  | + (10)                 |
| L2                             | §) 225 <sup>+</sup> )             | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                           | 20 - 30                                          | 20 - 30  | + (<50)                |
| L3                             | §) 89 <sub>II</sub>               | 6                                                    | 80 - 90                                          | 10 - 20  | -                      |
|                                | 391                               | 3                                                    | 100                                              | 0        | -                      |
| L4                             | §) 178                            | 3                                                    | 80 - 90                                          | <20      | -                      |
| L5                             | §) 70                             | 3                                                    | 60 - 70                                          | <30      | + (10)                 |
|                                | 70                                | 4,5                                                  | 40 - 50                                          | 40 - 50  | + (10)                 |
| L6                             | §) 227                            | 3                                                    | 70 - 80                                          | 20       | -                      |
| L7/L12                         | 87 <sub>V</sub>                   | 3                                                    | 40 - 50                                          | 20 - 30  | + (30)                 |
|                                | §) 216                            | 3                                                    | 30 - 40                                          | 20 - 30  | + (40)                 |
| L8                             | §) 386 <sup>+</sup> )             | 100 $\mu$ l <sup>+</sup> )                           | 70 - 80                                          | <20      | + (10)                 |
| L9                             | §) 388 <sub>II</sub>              | 3                                                    | <70                                              | 30 - 40  | -                      |
| L10                            | 351                               | 1,5                                                  | 60 - 70                                          | 20 - 30  | + (10)                 |
|                                | §) 351                            | 3                                                    | 50 - 60                                          | 20 - 30  | + (20)                 |
|                                | 351                               | 7,5                                                  | 10 - 20                                          | 10 - 20  | + (70)                 |
| L11                            | §) 324                            | 3                                                    | 70 - 80                                          | 20 - 30  | -                      |
| L12                            | s. L7                             |                                                      |                                                  |          |                        |

Fortsetzung: Tabelle 11

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten <sub>70S</sub> | % Restmenge un-<br>ter 70S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| L13                            | 259                               | 3                                                    | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | §) 259 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 80 - 90                                          | 0        | + (>10)                |
| L14                            | §) 294                            | 3                                                    | 30 - 40                                          | 20 - 30  | + (40)                 |
|                                | 294                               | 4,5                                                  | 10                                               | 10 - 20  | + (>70)                |
| L15                            | §) 230                            | 3                                                    | 70 - 80                                          | 10 - 20  | + (10)                 |
| L16                            | 231                               | 1,5                                                  | 80 - 90                                          | 0        | + (>10)                |
|                                | §) 231                            | 6                                                    | 60                                               | 20 - 30  | + (>10)                |
|                                | 231                               | 7,5                                                  | 40 - 50                                          | 30       | + (>20)                |
| L17                            | 76                                | 3                                                    | 80 - 90                                          | 10 - 20  | -                      |
|                                | §) 393 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 30 - 40                                          | 20 - 30  | + (40)                 |
| L18                            | §) 260                            | 3                                                    | 60                                               | 20 - 30  | + (>10)                |
|                                | 260                               | 4,5                                                  | 40 - 50                                          | 30       | + (>20)                |
| L19                            | §) 233                            | 4,5                                                  | 100                                              | 0        | -                      |
|                                | 314                               | 4,5                                                  | 100                                              | 0        | -                      |
| L20                            | §) 91                             | 3                                                    | 70 - 80                                          | 20       | -                      |
| L21                            | §) 392 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 30 - 40                                          | 40 - 50  | + (20)                 |
| L22                            | §) 234 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 70 - 80                                          | 20 - 30  | -                      |
| L23                            | §) 235                            | 3                                                    | 30 - 40                                          | 20       | + (>40)                |
| L24                            | §) 293 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 40 - 50                                          | 30       | + (>20)                |

Fortsetzung: Tabelle 11

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten <sub>70S</sub> | % Restmenge un-<br>ter 70S-Monome-<br>ren-Gipfel | % Dimere | % größere<br>Aggregate |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------|------------------------|
| L25                            | §) 262 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 60 - 70                                          | 20 - 30  | + (10)                 |
| L26                            | §) 409 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 40 - 50                                          | 30       | + (>20)                |
| L27                            | §) 238                            | 3                                                    | 10 - 20                                          | 30       | + (50)                 |
|                                | 238                               | 9                                                    | 0                                                | 0        | + (100)                |
| L28                            | §) 263 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 20                                               | 40       | + (40)                 |
| L29                            | §) 318 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 90                                               | <10      | -                      |
| L30                            | §) 265 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | <60                                              | 10 - 20  | + (>20)                |
| L31                            | §) 384 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 50 - 60                                          | 20 - 30  | + (20)                 |
| L32                            | §) 387 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 70 - 80                                          | 0        | + (>20)                |
| L33                            | §) 218 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 40                                               | 40 - 50  | + (>10)                |
|                                | 273 <sup>+) </sup>                | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 60 - 70                                          | 20       | + (>10)                |
| L34                            | §) 389 <sup>+) </sup>             | 100 $\mu$ l <sup>+) </sup>                           | 70                                               | 10 - 20  | + (>10)                |

Die Trennungsprofile der mit ( § ) markierten Versuche sind in Abb. 10 dargestellt. 1 "IgG-Konzentrationseinheit<sub>70S</sub>" entspricht

0,2 OD<sub>280</sub> IgG/2,0 OD<sub>260</sub> 70S. Für weitere Einzelheiten s. Legende zu Tabelle 3.

<sup>+)</sup>  unfraktioniertes  $\gamma$ -Globulin

Tabelle 12. Konzentrationsverhältnisse zwischen undissoziierten 70S Ribosomen und IgG-Antikörpern bei den einzelnen Versuchen

|                            | 0,5 | 1    | 1,5  | 2    | 3    | 4    | 4,5  | 6    | 7    | 7,5  | 9    | 10    | IgG-Konz.-<br>einhei-<br>ten 70S |
|----------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|----------------------------------|
| 2,0 OD <sub>260</sub> 70S  |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |                                  |
| 0,67 OD <sub>260</sub> 30S | 0,1 | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,6  | 0,8  | 0,9  | 1,2  | 1,4  | 1,5  | 1,8  | 2,0   | OD <sub>280</sub> IgG            |
| 1,33 OD <sub>260</sub> 50S |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |                                  |
| 125 µg 70S                 |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |                                  |
| 42 µg 30S                  | 80  | 160  | 240  | 320  | 480  | 640  | 720  | 960  | 1120 | 1200 | 1440 | 1600  | µg IgG                           |
| 83 µg 50S                  |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |                                  |
| 47,2 pMol 70S              |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |                                  |
| 46,4 pMol 30S              | 530 | 1070 | 1600 | 2140 | 3200 | 4270 | 4800 | 6400 | 7480 | 8000 | 9600 | 10680 | pMol IgG                         |
| 53,8 pMol 50S              |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |                                  |
| Mol IgG/Mol 70S            | 11  | 22   | 33   | 44   | 66   | 88   | 99   | 132  | 154  | 165  | 198  | 220   |                                  |
| Mol IgG/Mol 30S            | 11  | 22   | 33   | 44   | 66   | 88   | 99   | 132  | 154  | 165  | 198  | 220   |                                  |
| Mol IgG/Mol 50S            | 10  | 20   | 30   | 40   | 60   | 80   | 90   | 120  | 140  | 150  | 180  | 200   |                                  |

Legende s. S. 88

## Legende zu Tabelle 12:

Bei den Berechnungen wurde berücksichtigt:

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  - Werte (Extinktion einer 1%igen Lösung bei 1 cm Küvetten-Schicht-  
dicke):  
für Ribosomen : 160  
für IgG-Antikörper: 12,5

Molekulargewichte:  
für 70S Ribosomen :  $2,65 \times 10^6$  Dalton  
für 30S Untereinheiten:  $0,9 \times 10^6$  Dalton  
für 50S Untereinheiten:  $1,55 \times 10^6$  Dalton  
für IgG-Antikörper :  $1,5 \times 10^5$  Dalton

Die in Reihe 'Mol IgG/Mol Ribosomen' angegebenen Werte sind jeweils auf- oder abgerundet.

## Legende zu Abbildung 9:

Je 2,0 OD<sub>260</sub> 70S Ribosomen wurden mit IgGs gegen 30S-Einzelproteine inkubiert (s. "Materialien und Methoden"). Die "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>70S</sub>" sind Tabelle 10 zu entnehmen (s. ( § ) in Spalte "Antikörper von Tiernummer"). 70S Ribosomen wurden zur Kontrolle mit 9 "Einheiten" NIS-IgG inkubiert.

Die verwendeten Antikörperpräparationen sind mit denen identisch, deren Auswirkungen auf isolierte Untereinheiten in Abb. 3 gezeigt werden.

Die Gipfelfraktionen enthalten folgende Komponenten (in Sedimentationsrichtung): IgG-Antikörper, unvernetzte 70S, 70S-IgG-70S-Komplexe ("Dimere"), höhervernetzte 70S-IgG-Komplexe (Aggregate) (als Beispiel s. S11). Vorschultern der 70S-Gipfelfraktionen, die einige Antikörper hervorrufen, repräsentieren Untereinheiten dissoziierter Ribosomen.

Die Transmissionsprofile wurden in einer Durchlaufküvette eines Zeiss- (PM4) Spektralphotometers bei 260 nm gemessen und mit einem Schreiber (Kipp und Zonen) registriert.



Abb. 9. Rohrzucker-Dichtegradienten - Effekte von Anti-S1, -S2, ... bis -S21 auf undissoziierte 70S Ribosomen

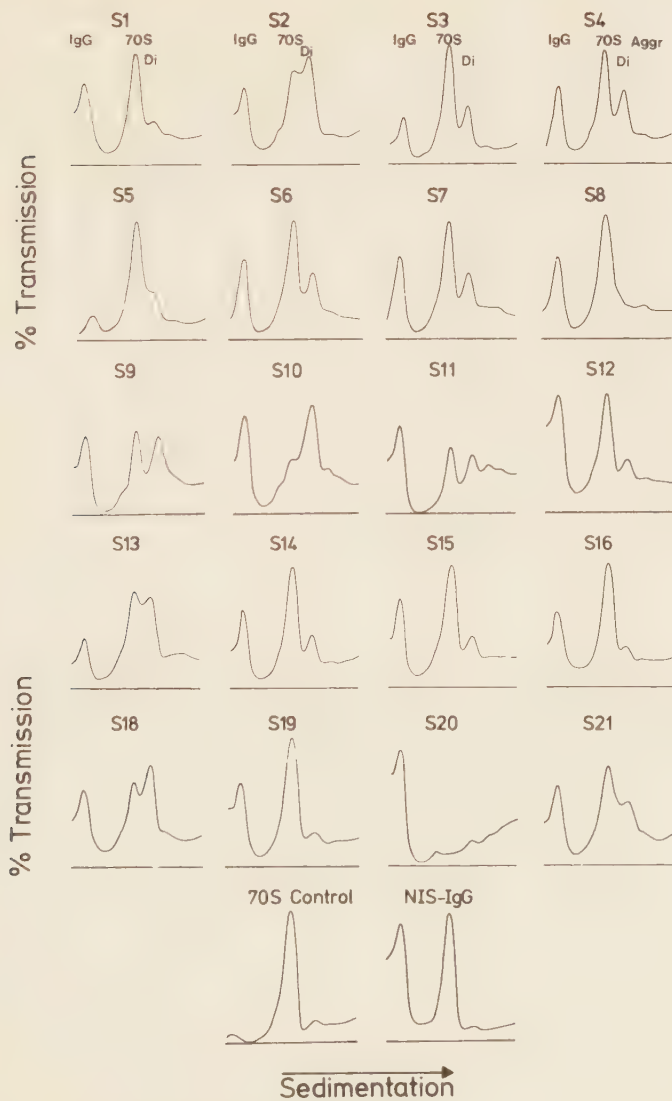
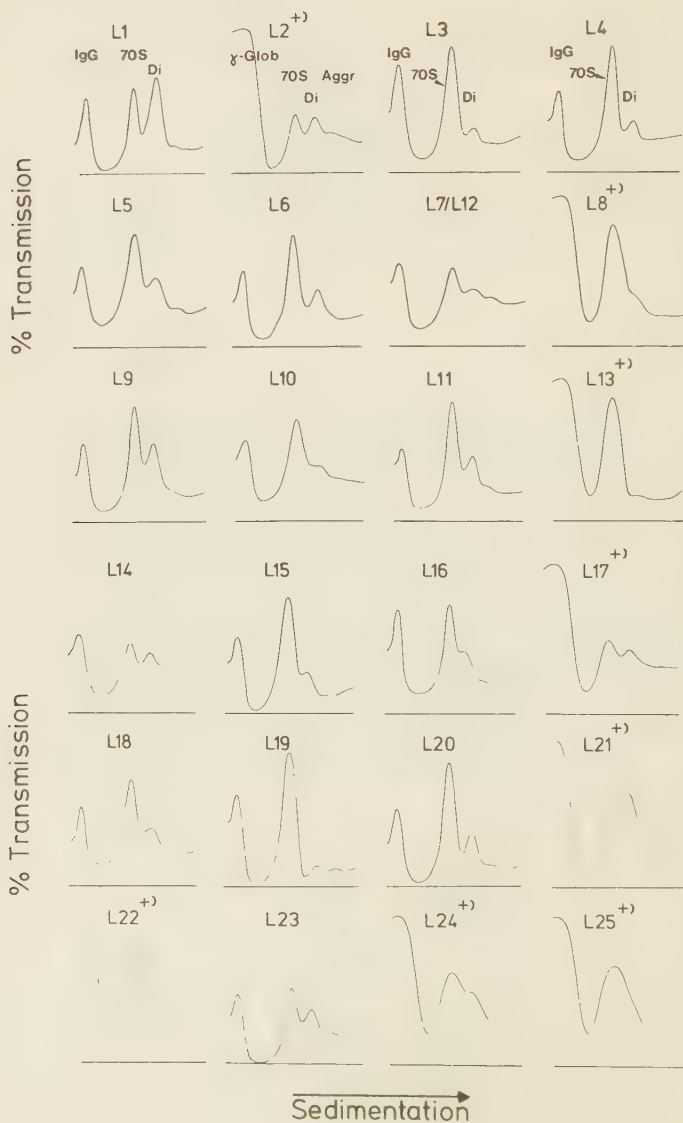
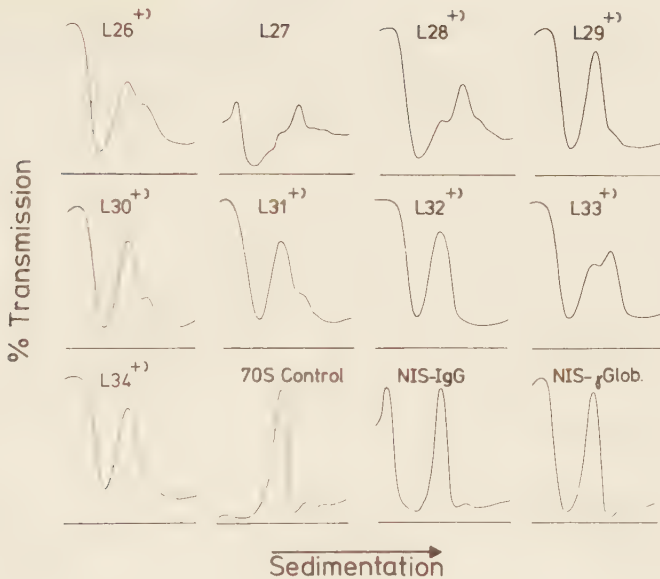


Abb. 10. Rohrucker-Dichtegradienten - Effekte von Anti-L1, -L2, ... bis -L34 auf undissoziierte 70S Ribosomen



Fortsetzung: Abb. 10



IgG-Präparationen gegen 50S-Einzelproteine, in einigen Fällen auch unfraktionierte  $\gamma$ -Globulin-Aufarbeitungen ( + ), wurden mit je 2,0 OD<sub>260</sub> 70S Ribosomen inkubiert (s. 'Materialien und Methoden'). Die "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>70S</sub>" bzw.  $\gamma$ -Globulin-Konzentrationen sind Tabelle 11 zu entnehmen (s. ( § ) in Spalte "Antikörper von Tiernummer"). Zur Kontrolle wurden 70S Ribosomen mit 9 "Einheiten" NIS-IgG bzw. 100  $\mu$ l NIS- $\gamma$ -Globulin inkubiert. Für weitere Erklärungen s. Legende zu Abb. 9.

Die verwendeten Antikörperpräparationen sind mit denen identisch, deren Auswirkungen auf isolierte Untereinheiten in Abb. 4 gezeigt werden.

Tabelle 13. Semiquantitative Auswertung der Effekte von Antikörpern gegen 30S-Proteine auf undissoziierte 70S Ribosomen

| Effekte der Antikörper   |            | Antikörper gegen ribosomales Protein                       |
|--------------------------|------------|------------------------------------------------------------|
| Reduktion                | stark      | S20 >> S10 > S11 > S18 > S2, S9                            |
|                          | mittel     | S21 > S1, S4, S6                                           |
|                          | schwach    | S3, S7 > S5, S12 > S14, S15, S16, S19 > S8                 |
|                          | keine Red. | diverse NIS-IgGs                                           |
| ausschließlich Dimere    |            | S2 > S13 > S4, S6 > S3, S7 > S5, S12 > S14, S15 > S19, S16 |
| ausschließlich Aggregate |            | S8                                                         |
| Dimere + Aggregate       |            |                                                            |
| vorwiegend Dimere        |            | S10 > S18 >> S9 > S21 > S1                                 |
| vorwiegend Aggregate     |            | S20 >> S11                                                 |

Die Trennungsprofile der einzelnen Versuche sind in Abbildung 9 dargestellt. Detaillierte quantitative Auswertungen werden in Tabelle 10 gegeben (s. §) in Spalte "Antikörper von Tiernummer").

|                   |                                |              |
|-------------------|--------------------------------|--------------|
| Starke Reduktion: | Verminderung des 70S-Gipfels ) |              |
|                   | auf $\leq 50\%$ Restmenge )    | im Vergleich |
| Mittlere "        | Verminderung des 70S-Gipfels ) |              |
|                   | auf $>50\% - 70\%$ Restmenge ) | zur          |
| Schwache "        | Verminderung des 70S-Gipfels ) | Kontrolle    |
|                   | auf $>70\% - 90\%$ Restmenge ) |              |

Tabelle 14. Semiquantitative Auswertung der Effekte von Antikörpern gegen SOS-Proteine auf undissoziierte 70S Ribosomen

| Effekte der Antikörper   |            | Antikörper gegen ribosomales Protein                                                                                                                                                                              |
|--------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Reduktion                | stark      | L27 > L28 <sup>+</sup> ) > L2 <sup>+</sup> ) > L7/L12, L14, L17 <sup>+</sup> ), L21 <sup>+</sup> ), L23 > L33 <sup>+</sup> ) > L1, L24 <sup>+</sup> ), L26 <sup>+</sup> )                                         |
|                          | mittel     | L10, L31 <sup>+</sup> ) > L16, L18 > L5, L9, L30 <sup>+</sup> ) > L34 <sup>+</sup> )                                                                                                                              |
|                          | schwach    | L25 <sup>+</sup> ) > L6, L8 <sup>+</sup> ), L11, L15, L20, L22 <sup>+</sup> ), L32 <sup>+</sup> ) > L3, L4, L13 <sup>+</sup> ) > L29 <sup>+</sup> )                                                               |
|                          | keine Red. | diverse NIS-IgGs u. -γ-Globuline, L19                                                                                                                                                                             |
| ausschließlich Dimere    |            | L9 > L11, L22 <sup>+</sup> ) > L6, L20 > L3, L4 > L29 <sup>+</sup> )                                                                                                                                              |
| ausschließlich Aggregate |            | L32 <sup>+</sup> ) > L13 <sup>+</sup> )                                                                                                                                                                           |
| Dimere + Aggregate       |            |                                                                                                                                                                                                                   |
| vorwiegend Dimere        |            | L1, L21 <sup>+</sup> ), L33 <sup>+</sup> ) > L28 <sup>+</sup> ) > L24 <sup>+</sup> ), L26 <sup>+</sup> ) > L5, L10, L16, L18, L25 <sup>+</sup> ), L31 <sup>+</sup> ) > L8 <sup>+</sup> ), L15, L34 <sup>+</sup> ) |
| vorwiegend Aggregate     |            | L27 > L2 <sup>+</sup> ), L23 > L7/L12, L14, L17 <sup>+</sup> ) > L30 <sup>+</sup> )                                                                                                                               |

Die Trennungsprofile der einzelnen Experimente sind in Abbildung 10 dargestellt. Detaillierte quantitative Auswertungen werden in Tabelle 11 gegeben (s. §) in Spalte "Antikörper von Tiernummer").

Für Klassifizierung der Reduktionseffekte siehe Legende zu Tabelle 13.

1) unfraktionierte γ-Globulin-Präparation

Untereinheiten behandelt worden (s. die Abschnitte I.2.4.1. u. I.2.4.2.). Die Ergebnisse mit 70S Ribosomen sind in den Tabellen 6c und 7c zusammengefaßt.

#### I.2.6.2. Vergleich der Proteinzugänglichkeit in isolierten Untereinheiten und undissoziierten 70S Ribosomen

Um Aussagen über Zugänglichkeitsunterschiede der ribosomalen Proteine in isolierten Subpartikeln und undissoziierten 70S Ribosomen treffen zu können, wurden die quantitativ bestimmten Reaktionseffekte der proteinspezifischen Antikörper auf Untereinheiten (s. Tabellen 3 u. 4) und 70S Ribosomen (s. Tabellen 10 u. 11) miteinander verglichen. Das war zulässig, weil in beiden Systemen jeweils dieselben Immunglobulinpräparationen getestet wurden sowie Antigen und Antikörper in gleichen Konzentrationsverhältnissen vorlagen.

#### Unterschiedliche Reduktionseffekte

Als charakteristisches Maß für den Vergleich wurde die unterschiedliche Reduktion des Untereinheiten- und des 70S-Monomeren-Gipfels durch die einzelnen Antikörper gewählt (Tabellen 15 u. 16). Differierte die Reduktion beider Gipfel um mindestens 20%, wurde der Unterschied als signifikant gewertet. Während die Antikörper gegen 40 der 54 untersuchten Proteine gleiche Reduktionseffekte auf 70S Ribosomen und die entsprechenden Untereinheiten hervorriefen, führten die Immunglobuline gegen 14 Einzelproteine zu abweichenden Reduktionen (Tabelle 17a).

a. Untereinheiten-Monomeren-Gipfel stärker reduziert als 70S-Monomeren-Gipfel: L19 ist das einzige Protein, das in undissoziierten 70S Ribosomen im Gegensatz zu isolierten Untereinheiten völlig unzugänglich ist. Zwei Anti-L19-Präparationen aus verschiedenen Tieren riefen mit 50S Untereinheiten starke, mit 70S Ribosomen dagegen keinerlei Reaktionen hervor (Tabellen 16 u. 17a). Es darf - wie bereits ausgeführt - angenommen werden, daß die in isolierten 50S Untereinheiten zugänglichen Antikörperbindungsstellen von L19 durch die Anlagerung der 30S Subpartikel im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter 70S Ribosomen verdeckt sind.

Es liegen jedoch Hinweise vor, daß die ribosomalen Untereinheiten in Abhängigkeit des Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichts unterschiedliche Konformationen aufweisen (s. Abschnitt 1.1. der Schlußdiskussion). Dadurch könnten auch solche Proteine, die außerhalb des Grenzbereiches vorkommen,



in 70S Ribosomen weniger zugänglich sein als in isolierten Untereinheiten. Vor allem für Proteine, deren Erreichbarkeit in 70S Ribosomen lediglich partiell vermindert ist (wie S4, S12, S13 und L29; Tabellen 15-17a), kann folglich nicht entschieden werden, ob einige ihrer Antikörperbindungsstellen im Untereinheiten-Grenzbereich vorliegen oder durch Konformationsänderungen der Subpartikel verdeckt sind. Ergebnisse anderer Untersuchungen sind heranzuziehen, um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden (s. Abschnitt 1.1. der Schlußdiskussion).

b. 70S-Monomeren-Gipfel stärker reduziert als Untereinheiten-Monomeren-Gipfel: Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Resultaten lassen Ergebnisse, die eine stärkere Reduktion des 70S-Gipfels gegenüber dem Untereinheiten-Gipfel wiedergeben, auf unterschiedliche Konformationen der Subpartikel schließen. Verstärkte Reaktivität mit 70S Ribosomen konnte für 9 Proteine nachgewiesen werden: Antikörper gegen S20, L7/L12, L18, L21, L27, L28, L33 und L34 reagierten mit 70S Ribosomen stärker als mit den entsprechenden isolierten Untereinheiten (Tabelle 15, 16 u. 17a). Lediglich aus den Resultaten mit Anti-S20, -L21 und -L27 können dabei aufgrund folgender Einschränkungen keine Schlüsse auf unterschiedliche Subpartikelkonformationen abgeleitet werden: Wie bereits erwähnt, ist das 30S-Protein S20 mit dem Protein L26 der 50S Untereinheit identisch (Wittmann et al., 1974; Tischendorf, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Anti-L21 und -L27 waren geringfügig mit Aktivitäten gegen 30S-Proteine verunreinigt. Es ist offensichtlich, daß in diesen drei Fällen 70S Ribosomen, bedingt durch die Anwesenheit beider Untereinheiten, verstärkt reagieren sollten.

#### Unterschiedliche Bildung von höhervernetzten Aggregaten

Beim Vergleich der Proteinzugänglichkeit in isolierten Untereinheiten und 70S Ribosomen fiel auf, daß insbesondere die Antikörper gegen 30S-Einzelproteine mit 70S Ribosomen etwas geringere - wenn auch nicht in jedem Fall signifikant verminderte - Aggregationseffekte hervorriefen als mit 30S Untereinheiten (vergleiche Tabelle 3 u. 10 bzw. Tabelle 4 u. 11). Daraus kann gefolgert werden, daß die 30S-Proteine in 70S Ribosomen im allgemeinen etwas weniger reaktiv sind als in isolierten 30S Subpartikeln.

Für einige Antikörper, die den Untereinheiten-Monomeren-Gipfel stärker reduzierten als den 70S-Gipfel, wurde erwartet, daß sie auch zur vermehrten Bildung größerer Komplexe führten. Ein Vergleich der Aggregationseffekte zeigte, daß in der Tat zwei dieser Antikörper (Anti-S4 und -L29) mit

isolierten Subpartikeln um wenigstens 20% mehr Aggregate bildeten als mit 70S Ribosomen (Tabelle 17b). Aufgrund der zuvor beschriebenen Vorbehalte kann wiederum nicht eindeutig geschlossen werden, daß S4 und L29 teilweise im Untereinheiten-Grenzbereich vorliegen. ●

Dasselbe gilt für die Proteine S2, S10, S16, S18, L2, L8, L25 und L31. Die Experimente mit den entsprechenden Antikörpern ergaben, daß bei jeweils gleicher 70S- und Subpartikel-Monomeren-Reduktion mehr Aggregate mit Untereinheiten gebildet wurden als mit 70S Ribosomen (Tabelle 17b).

Dagegen läßt eine Verschiebung zu stärkerer Aggregation bei 70S Ribosomen, wie sie mit Anti-L28 beobachtet wurde (Tabelle 17b), wieder eine klare Aussage darüber zu, daß isolierte Untereinheiten eine andere Konformation aufweisen als Subpartikel in undissoziierten Ribosomen. Wegen der schon besprochenen Identität von S20 und L26 muß dabei der gleiche Effekt durch Anti-S20 abermals unberücksichtigt bleiben.

Tabelle 15. 30S-ribosomale Proteine - ihre Zugänglichkeit in isolierten 30S Untereinheiten und undissoziierten 70S Ribosomen für Antikörper

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten | % Restmenge unter Monomeren-Gipfel |         |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------|
|                                |                                   |                                       | 30S                                | 70S     |
| S1                             | 221 <sub>II</sub>                 | 2                                     | 90                                 | 70 - 80 |
|                                | 221 <sub>II</sub>                 | 4                                     | 80 - 90                            | 70      |
| S2                             | 147                               | 1                                     | 90 - 100                           | 70 - 80 |
|                                | 147                               | 4                                     | 30 - 40                            | 40 - 50 |
|                                | 307                               | 4                                     | 30 - 40                            | 30 - 40 |
| S3                             | 123 <sub>II</sub>                 | 0,5                                   | 90 - 100                           | 80 - 90 |
|                                | 123 <sub>II</sub>                 | 2                                     | 60 - 70                            | 70 - 80 |
| S4                             | 67 <sub>II</sub>                  | 2                                     | 100 <sup>§)</sup>                  | 100     |
|                                | 67 <sub>II</sub>                  | 8                                     | >90                                | 90      |
|                                | 194                               | 4                                     | 40 - 50                            | 70 - 80 |
|                                | H4                                | 4                                     | 30 - 40                            | 70      |
| S5                             | 113                               | 0,5                                   | 80 - 90                            | 80 - 90 |
|                                | 113                               | 1                                     | 60 - 70                            | 80      |
| S6                             | 114                               | 4                                     | 60 - 70                            | 70      |
| S7                             | 125 <sub>II</sub>                 | 4                                     | 60 - 70                            | 70 - 80 |
| S8                             | 77                                | 4                                     | 70 - 80                            | 90      |
|                                | 362                               | 4                                     | 90                                 | 90      |
| S9                             | 132 <sub>II</sub>                 | 1                                     | 50                                 | 40 - 50 |
| S10                            | 173 <sub>II</sub>                 | 4                                     | 30                                 | 20      |

Fortsetzung: Tabelle 15

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten | % Restmenge unter Monomeren-Gipfel |         |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------|
|                                |                                   |                                       | 30S                                | 70S     |
| S11                            | 222 <sub>III</sub>                | 2                                     | 50 - 60                            | 50 - 60 |
|                                | 222 <sub>III</sub>                | 4                                     | 30 - 40                            | 30      |
| S12                            | 129 <sub>II</sub>                 | 2                                     | 90                                 | 100     |
|                                | H18                               | 4                                     | 70                                 | >90     |
|                                | H18                               | 9                                     | 60                                 | 80      |
| S13                            | 143                               | 2                                     | 30                                 | 50      |
| S14                            | 306                               | 4                                     | 60 - 70                            | 80 - 90 |
| S15                            | 146                               | 4                                     | 60 - 70                            | 80 - 90 |
| S16                            | 40                                | 4                                     | >70                                | 80 - 90 |
|                                | 148                               | 4                                     | 100                                | 80 - 90 |
| S17                            | nicht<br>getestet                 |                                       |                                    |         |
| S18                            | 133 <sub>II</sub>                 | 4                                     | 20 - 30                            | <40     |
|                                | 144                               | 4                                     | 100                                | 90      |
| S19                            | 172                               | 4                                     | 70 - 80                            | <90     |
| S20                            | 191                               | 2                                     | 20                                 | 0       |
| S21                            | 199                               | 2                                     | 60 - 70                            | 50 - 60 |

Die Reduktionseffekte auf die 30S- und 70S-Monomeren-Gipfel sind bei entsprechenden IgG-Konzentrationen jeweils derselben Antikörperpräparation verglichen (s. Tabellen 3 und 10).

H = in Hammel gewonnene Antikörper

§ = 4 "IgG-Konzentrationseinheiten"

Tabelle 16. 50S-ribosomale Proteine - ihre Zugänglichkeit in iso-  
lierten 50S Untereinheiten und undissoziierten 70S Ribosomen für  
Antikörper

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten | % Restmenge unter Monomeren-Gipfel |         |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------|
|                                |                                   |                                       | 50S                                | 70S     |
| L1                             | 629 <sub>II</sub>                 | 3                                     | 40                                 | 40 - 50 |
| L2                             | 225 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 30                                 | 20 - 30 |
| L3                             | 89 <sub>II</sub>                  | 6                                     | 70 - 80                            | 80 - 90 |
|                                | 391                               | 3                                     | 100                                | 100     |
| L4                             | 178                               | 3                                     | 80                                 | 80 - 90 |
| L5                             | 70                                | 3                                     | 70                                 | 60 - 70 |
| L6                             | 227                               | 3                                     | <80                                | 70 - 80 |
| L7/L12                         | 87 <sub>V</sub>                   | 3                                     | >60                                | 40 - 50 |
|                                | 216                               | 3                                     | <60                                | 30 - 40 |
| L8                             | 386 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 50 - 60                            | 70 - 80 |
| L9                             | 388 <sub>II</sub>                 | 3                                     | 70 - 80                            | <70     |
| L10                            | 351                               | 3                                     | 40                                 | 50 - 60 |
| L11                            | 324                               | 3                                     | 70 - 80                            | 70 - 80 |
| L12                            | s. L7                             |                                       |                                    |         |
| L13                            | 259                               | 3                                     | >90                                | 100     |
|                                | 259 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 80 - 90                            | 80 - 90 |
| L14                            | 294                               | 3                                     | 30 - 40                            | 30 - 40 |

Fortsetzung: Tabelle 16

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten | % Restmenge unter Monomeren-Gipfel |                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
|                                |                                   |                                       | 50S                                | 70S               |
| L15                            | 230                               | 3                                     | 70 - 80                            | 70 - 80           |
| L16                            | 231                               | 6                                     | 60                                 | 60                |
| L17                            | 76                                | 3                                     | 80 - 90                            | 80 - 90           |
|                                | 393 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 30 - 40                            | 30 - 40           |
| L18                            | 260                               | 3                                     | >80                                | 60                |
| L19                            | 233                               | 3                                     | 40                                 | 100 <sup>§)</sup> |
|                                | 314                               | 3                                     | 50                                 | 100 <sup>§)</sup> |
| L20                            | 91                                | 3                                     | 70                                 | 70 - 80           |
| L21                            | 392 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 80                                 | 30 - 40           |
| L22                            | 234 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 70                                 | 70 - 80           |
| L23                            | 235                               | 3                                     | 30                                 | 30 - 40           |
| L24                            | 293 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 60 - 70                            | 40 - 50           |
| L25                            | 262 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 40 - 50                            | 60 - 70           |
| L26                            | 409 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 50                                 | 40 - 50           |
| L27                            | 238                               | 3                                     | 90                                 | 10 - 20           |
|                                | 238                               | 9                                     | >50                                | 0                 |
| L28                            | 263 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 80 - 90                            | 20                |
| L29                            | 318 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu$ l <sup>+) )</sup>       | 50 - 60                            | 90                |



Fortsetzung: Tabelle 16

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | Antikörper<br>von Tier-<br>nummer | IgG-Konzen-<br>trationsein-<br>heiten | % Restmenge unter Monomeren-Gipfel |         |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------|
|                                |                                   |                                       | 50S                                | 70S     |
| L30                            | 265 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu\text{l}^{+)$             | 50 - 60                            | < 60    |
| L31                            | 384 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu\text{l}^{+)$             | 50                                 | 50 - 60 |
| L32                            | 387 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu\text{l}^{+)$             | 70                                 | 70 - 80 |
| L33                            | 218 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu\text{l}^{+)$             | 70 - 80                            | 40      |
|                                | 273 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu\text{l}^{+)$             | 80                                 | 60 - 70 |
| L34                            | 389 <sup>+) )</sup>               | 150/100 $\mu\text{l}^{+)$             | 90                                 | 70      |

Die Reduktionseffekte auf die 50S- und 70S-Monomeren-Gipfel sind bei entsprechenden IgG- bzw.  $\gamma$ -Globulin-Konzentrationen jeweils derselben Antikörperpräparation verglichen (s. Tabellen 4 und 11).

§) 4,5 "IgG-Konzentrationseinheiten"

Tabelle 17. Unterschiedliche Antikörpereffekte auf isolierte Untereinheiten und undissoziierte 70S Ribosomen

a. Reduktionseffekte

Verstärkte Reduktion des Monomeren-Gipfels bei Verwendung von isolierten Untereinheiten durch: Anti-S4 > -S12, -S13; Anti-L19<sup>§)</sup> >> -L29

Verstärkte Reduktion des Monomeren-Gipfels bei Verwendung von undissoziierten 70S Ribosomen durch: Anti-S20<sup>a)</sup>; Anti-L27<sup>b)</sup> > -L28 > -L21<sup>b)</sup> > -L33 > -L7/L12, -L18, -L34

b. Aggregationseffekte

Verstärkte Aggregation bei Verwendung von isolierten Untereinheiten durch: Anti-S18 > -S2, -S4, -S10 > -S16; Anti-L29 > -L8 > -L2, -L25, -L31

Verstärkte Aggregation bei Verwendung von undissoziierten 70S Ribosomen durch: Anti-S20<sup>a)</sup>; Anti-L28

Detaillierte quantitative Auswertungen der Versuche werden für die 30S-Proteine in den Tabellen 3, 10 und 15 gegeben, für die 50S-Proteine in den Tabellen 4, 11 und 16. Die Antikörpereffekte auf isolierte Untereinheiten und undissoziierte 70S Ribosomen variieren um ca. 20% oder mehr.

Die unterstrichenen Antikörper führen gleichzeitig zu unterschiedlicher Reduktion und Aggregation.

§) völlig unzugänglich in 70S Ribosomen

a) S20 ist mit L26 identisch (Wittmann et al., 1974; Tischendorf, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse).

b) Anti-L21 und -L27 waren geringfügig mit Aktivitäten gegen 30S-Proteine verunreinigt.

### I.3. Diskussion

#### I.3.1. Grundlagen und Eigenschaften der Ribosomen-Antikörper-Reaktion

##### I.3.1.1. Natur der reaktiven antigenen Determinanten ribosomaler Proteine

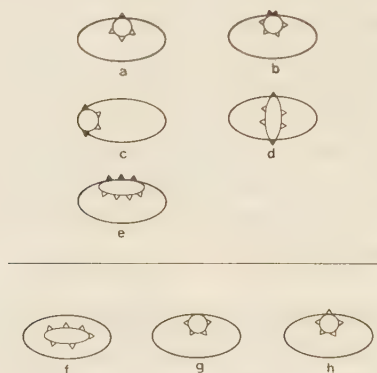
Ein Antiserum enthält ein Gemisch von Antikörperpopulationen, die gegen verschiedene antigene Determinanten auf der Oberfläche des Antigens spezifisch sind. Zwei Arten von Determinanten werden unterschieden: Sequenzabhängige Determinanten, die sich bei Proteinen aus Sequenzen von mindestens 4-6 Aminosäuren aufbauen, oder konformationsabhängige Determinanten, die auf bestimmten räumlichen Konformationen des Antigens beruhen (zur Übersicht s. Kabat, 1966; Sela, 1966, 1969, 1973; Arnon, 1971; Benjamini et al., 1972; s. auch Abschnitt 5. der Einleitung).

Antikörper gegen ribosomale Einzelproteine sind vermutlich zum größten Teil sequenzspezifisch, d.h. gegen sequenzabhängige Determinanten gerichtet: Die zur Immunisierung verwendeten Einzelproteine werden unter denaturierenden Bedingungen isoliert und in denaturiertem Zustand in die Tiere injiziert.

Untersuchungen mit isolierten ribosomalen Proteinen bestätigten diese Annahme. Antiseren gegen Einzelproteine wurden mit Bruchstücken dieser Proteine abgesättigt (absorbiert) und auf ihre verbleibende Präzipitationskapazität hin untersucht. Die verwendeten Proteinfragmente, die durch Verdauung der Proteine mit Trypsin entstanden, sogenannte tryptische Peptide, hatten aufgrund ihrer geringen Größe keine oder nur eine gering ausgeprägte räumliche Struktur (Konformation) und wiesen deshalb hauptsächlich sequenzabhängige Determinanten auf. Die abgesättigten Seren präzipitierten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollseren ihre homologen unverdauten Proteine nur noch zu 20-30% (Stöffler und Wittmann, 1971a).

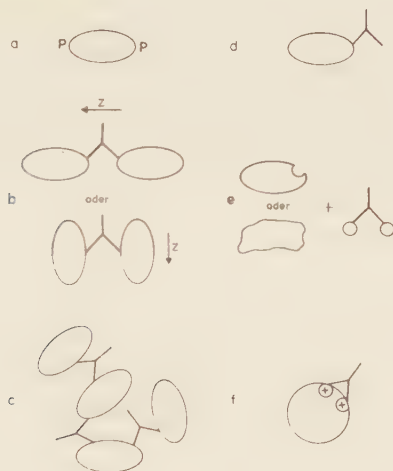
Mit Hilfe solcher Studien können aufgrund einiger Einschränkungen keine genauen Angaben über den Anteil der sequenzspezifischen (und folglich auch der konformationsspezifischen) Antikörper im Serum gemacht werden (zur Übersicht s. Benjamini et al., 1972). Da jedoch eindeutig gezeigt ist, daß die sequenzspezifischen Immunglobuline in Antiseren gegen ribosomale Einzelproteine überwiegen, kann eine Beteiligung dieser Antikörper an der Reaktion mit intakten Ribosomen angenommen werden. Demnach dürfte ein beträchtlicher Teil der an der Ribosomenoberfläche reaktiven Determinanten sequenzabhängig sein.

Abb. 11. Zugänglichkeit antigener Determinanten eines Proteins der 30S Untereinheit für Antikörper



- ▲ Erreichbare Determinante des Proteins; die getestete Antikörperpräparation enthält homologe Antikörper.
  - Δ Verborgene Determinante bzw. zugängliche Determinante, gegen welche die getestete Antikörperpräparation keine homologen Antikörper enthält.
- a-e Mindestens eine antigene Determinante wird von homologen Antikörpern an der Ribosomenoberfläche erkannt.
- f-h Antigene Determinanten werden nicht erkannt, weil das Protein total verdeckt (f) bzw. ohne Determinante an der Oberfläche ist (g) oder die verwendete Antikörperpräparation keine homologen Antikörper gegen eine erreichbare Determinante aufweist (h).
- Weiteres siehe im Text.

Abb. 12. Erwartete Produkte bei der Reaktion ribosomaler Untereinheiten mit Antikörpern



a Unbehandelte 30S Untereinheit (als gestrecktes Ellipsoid dargestellt; P = Pol)

b und c Interribosomale Vernetzungsprodukte

b 30S-IgG-30S-Komplex ("Dimer");  $\xrightarrow{Z}$  mögliche Ausrichtung des Komplexes bei der Zentrifugation in der Ultrazentrifuge in Abhängigkeit des Antikörperansatzortes

c Höhervernetzter 30S-IgG-Komplex

d Unvernetzter 30S-IgG-Komplex; das IgG bindet nur mit einem Fab-Arm

e Degradierter 30S Untereinheit; der Antikörper bewirkt die Dissoziation eines oder mehrerer Proteine vom Ribosom

f Intraribosomales Vernetzungsprodukt; nur zu erwarten bei Vorliegen identischer Proteine in einer Untereinheit (nur bei 50S) oder bei Vorliegen identischer Sequenzbereiche innerhalb eines einzigen Proteins bzw. verschiedener Proteine

### I.3.1.2. Die Zugänglichkeit antigener Determinanten an der Ribosomenoberfläche, ihre Reaktivität mit Antikörpern und die Bildung von Ribosomen-Antikörper-Komplexen

Die Erreichbarkeit antigener Determinanten der Proteine im intakten Ribosom und die zu erwartenden Reaktionsprodukte sind schematisch für Proteine der 30S Untereinheit dargestellt (Abb. 11 u. 12).

Die Zugänglichkeit von mindestens einer Determinante ist die Voraussetzung für die Reaktion von Antikörpern mit dem homologen ribosomalen Protein in situ (Abb. 11a-e). Eine erreichbare Determinante sollte stets auf der Ribosomenoberfläche liegen, weil für die IgG-Antikörper aufgrund ihrer Größe eine Diffusion in das Ribosom mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden kann (IgG:  $140\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 40\text{\AA}$ , MG  $1,5 \times 10^5$  Dalton; z.B. 30S Untereinheit:  $180\text{-}200\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 80\text{\AA}$ , MG  $0,9 \times 10^6$  Dalton; s. auch die Abschnitte 2. und 5. der Einleitung und III.2.1.). Deshalb dürfte ein Protein, das völlig im Ribosomeninneren verdeckt ist, auch nicht erkannt werden (Abb. 11f). Das Ausbleiben einer Reaktion bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß ein Protein an der Partikeloberfläche unerreichbar ist: 1. Ein an der Oberfläche orientiertes Protein könnte ohne antigene Determinante außen liegen (Abb. 11g). 2. Ein Protein könnte lediglich solche Determinanten zugänglich haben, gegen welche die untersuchte Antikörperpräparation aufgrund individualspezifischer Immunantwort des Tieres keine homologen Antikörper aufweist (Abb. 11h, s. dazu Abschnitt I.2.4.2.).

Welche Reaktionsprodukte wurden erwartet und welche konnten nachgewiesen werden?

#### a. Interribosomale Vernetzungsprodukte

##### Dimere

Als kleinste im Gradienten deutlich aufzutrennende Vernetzungsprodukte wurden Ribosomen-Antikörper-Ribosomen-Komplexe (Dimere) erwartet, in denen ein einziger bivalenter IgG-Antikörper mit seinen identischen Antigenbindungs-bereichen die Ribosomen an jeweils gleichen Antikörperbindungsstellen auf der Oberfläche verknüpft (Abb. 12b). Fast alle positiv reagierenden Antikörperpräparationen führten zur Bildung von Dimeren, die elektronenmikroskopisch eindeutig als solche zu identifizieren waren (s. Abb. 3,4,9 u.10; Tabellen 1-4, 10, 11, 13 u. 14; s. Ergebnisteil III.). Neben diesen typischen Dimeren konnten kürzlich elektronenoptisch in einigen wenigen Fällen spezielle Dimere nachgewiesen werden, in denen die Ribosomen gleichzeitig durch zwei IgGs vernetzt sind (Tischendorf et al., 1975).



Die Sedimentationskonstanten von 30S-IgG-30S- bzw. 50S-IgG-50S-Komplexen (= 30S- bzw. 50S-Dimeren) wurden eingehend mit Hilfe von Sedimentationsgeschwindigkeitsversuchen in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt (Stöffler et al., 1973; Morrison, 1974; Morrison, Tischendorf, Stöffler und Garrett, unveröffentlichte Ergebnisse; s. auch Abschnitt I.3.5.1.a). Die Sedimentationswerte der 30S-Dimere lagen je nach verwendetem Antikörper zwischen 41 und 48S, die der 50S-Dimere zwischen 70 und 75S. Die Schwankung der S-Werte war damit bei diesen Untersuchungen vor allem für die 30S-Dimere stärker ausgeprägt als bei den Rohrzucker-Dichtegradientenversuchen (hierbei abgeschätzte S-Werte der 30S-Dimere bei  $45S \pm 2S$ , die der 50S-Dimere bei  $70S \pm 2S$ ).

Morrison (1974) nahm an, daß die unterschiedlichen Sedimentationswerte speziell der einzelnen 30S-Dimere jeweils verschiedene Bindungsorte auf der Untereinheit widerspiegeln. Grundlage dafür war, daß die Untereinheiten nicht globulär sind, sondern ellipsoide bzw. unregelmäßige Formen haben (s. Abschnitt III.2.1.). Für die ellipsoid gestreckte 30S Untereinheit wurde z.B. erwartet, daß Dimere, in denen die Ansatzstelle des verknüpfenden Antikörpers am Pol der Subpartikel liegt, eine andere Form und somit ein anderes Sedimentationsverhalten aufweisen sollten als Komplexe, in denen der Antikörper auf dem Umfang der Symmetrieebene zu den Polen, dem Partikeläquator, ansetzt (für ein Beispiel s. Abb. 12b).

Derart unterschiedliche Dimerformen wurden elektronenmikroskopisch in der Tat nachgewiesen (s. Ergebnisteil III.), jedoch sind unterschiedliche Sedimentationseigenschaften sowohl für diese beiden extremen Dimertypen als auch für Übergangsformen unwahrscheinlich:

Die Komplexe sollten sich im Schwerfeld der Ultrazentrifuge stets so ausrichten, daß sie mit dem geringsten Reibungswiderstand sedimentieren (Svedberg und Pedersen, 1940). Geht man zunächst davon aus, daß die Dimere während der Zentrifugation ihre Struktur nicht wesentlich verändern, sind im Extremfall zwei mögliche Orientierungen der Komplexe im Schwerfeld zu erwarten (in Abb. 12b durch Pfeile angedeutet). Da der geringste Reibungswiderstand auf diese beiden Dimertypen etwa gleich sein dürfte, ist auch mit ähnlichem Sedimentationsverhalten zu rechnen.

IgG-Antikörper sind jedoch offensichtlich keine starren Moleküle: Elektronenmikroskopische Studien (Valentine und Green, 1967; Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a; s. auch Ergebnisteil III.), Röntgenkleinwinkel-Streuungsversuche (Pilz et al., 1973) und Markierungsexperimente

mit Fluoreszenzfarbstoffen (Werner et al., 1972) ergaben, daß IgGs als T- und/oder Y-förmige Moleküle vorliegen können. Aufgrund der Flexibilität der Antikörper ist anzunehmen, daß im Schwerfeld keine bestimmten starren Dimerformen vorliegen. Die Komplexe sollten stets mit kleinstem Partikeldurchmesser sedimentieren, der bei anzunehmender längsseitiger Aneinanderlagerung der beiden Untereinheiten für die meisten - wenn nicht gar für alle - auftretenden Dimere gleich sein dürfte. Auch in diesem Fall lassen ähnliche Reibungswiderstände auf die Komplexe nahezu gleiche Sedimentationswerte der Dimere erwarten. Die stärkeren Schwankungen der S-Werte bei der analytischen Ultrazentrifugation gegenüber den Gradientenversuchen dürften deshalb methodischer Natur sein (s. Abschnitt I.3.5.1.a).

### Höhervernetzte Aggregate

Während ausschließliche Dimerbildung, wie sie für einige IgG-Antikörper beobachtet wurde (s. Tabellen 1, 2, 13 u. 14), bedeutet, daß das homologe Protein mindestens eine antigene Determinante an der Ribosomenoberfläche zugänglich hat, läßt der Nachweis höhervernetzter Aggregate (Abb. 12c) den Schluß zu, daß wenigstens zwei Determinanten für bivalente IgGs erreichbar sind. Die Aggregationsergebnisse mit unfractionierten  $\gamma$ -Globulin-Präparationen können dabei nicht berücksichtigt werden. Wie schon zuvor besprochen, reicht bereits eine Determinante aus, daß die in  $\gamma$ -Globulinen enthaltenen multivalenten IgMs oder IgAs größere Komplexe bilden.

Neben den bereits allgemein ausgeführten Bedingungen für die Proteinerreichbarkeit (s. Abb. 11) gelten für die Zugänglichkeit von zwei und mehr Determinanten zwei weitere Voraussetzungen:

Die Determinanten müssen so weit voneinander entfernt sein, daß eine gleichzeitige Bindung von zwei oder mehreren IgGs an das Ribosom möglich ist. Die Subpartikel in Dimeren müssen derart orientiert sein, daß ein weiterer Antikörper freien Zugang zu einer zweiten Determinante hat.

IgG-Antikörper gegen 17 30S-Einzelproteine und 16 50S-Proteine führten zur Bildung von höhervernetzten Aggregaten (Tabelle 18). Jeweils zwei oder mehr erreichbare Determinanten sind unter folgenden Voraussetzungen denkbar:

Die Proteine liegen mit mehr als einer für Antikörper zugänglichen Kopie im Ribosom vor. In diesem Fall würde eine einzige erreichbare Determinante je Proteinkopie zur Bildung von Aggregaten ausreichen. Diese Deutung erklärt die Aggregation jedoch nur für zwei bis drei der 50S-Proteine (Tabelle 18). Untersuchungen über die stöchiometrischen Verhältnisse ribosomaler Proteine

in situ ergaben, daß von den aufgeführten Proteinen mit Sicherheit nur L7/L12 und vielleicht L5 mit mehr als einer Kopie in der 50S Untereinheit vorkommen, die übrigen 30S- und 50S-Proteine dagegen mit einer oder - statistisch gesehen - unter Umständen mit weniger als einer Kopie pro entsprechende Subpartikel vorliegen (Voynow und Kurland, 1971; Möller et al., 1972; Weber, 1972; Thammana et al., 1973; Hardy, 1975; Subramanian, 1975; s. den folgenden Abschnitt I.3.2. und Tabellen 19 u. 20). Folglich kann davon ausgegangen werden, daß fast alle der mit IgG-Antikörpern Aggregate bildenden Einzelproteine in situ jeweils mehrere Determinanten zur Antikörperbindung erreichbar haben. Dieser Befund läßt unter räumlichen Gesichtspunkten Aussagen über die Form der Proteine im Ribosom zu (s. Abschnitt 1.2. der Schlußdiskussion).

#### b. Unvernetzte Ribosomen-Antikörper-Komplexe

Das Auftreten derartiger Komplexe, in denen ein Ribosom lediglich mit einem (oder mehreren) Immunglobulin(en) besetzt, nicht aber mit einem anderen Ribosom verknüpft ist (Abb. 12d), war nur in einigen Fällen aus den Gradientenprofilen zu deuten. Mit den Antikörpern Anti-S2, -S3, -S5, -S14 und -L19 trat jeweils zwischen Monomer- und Dimer-Gipfel intermediär sedimentierendes Material auf (s. Abb. 3 u. 4). Dies könnte Zerfallsprodukte instabiler Dimere repräsentieren, die während der Zentrifugation dissoziieren (s. Abschnitt I.3.4.a). Unvernetzte Ribosomen-Antikörper-Komplexe wären weiterhin

#### Tabelle 18. Bildung höhervernetzter Untereinheiten-Antikörper-Aggregate durch bivalente IgG-Antikörper

##### a. IgG gegen 30S-Einzelprotein

S1, S2, S4, S5, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S14, S15, S16, S18, S19, S20, S21

##### b. IgG gegen 50S-Einzelprotein

L1, L3, L4, L5<sup>§)</sup>, L6, L7/L12<sup>§)</sup>, L9, L10, L14, L15, L16, L19, L20, L23, L27

Die ausführlichen Daten sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

§) L7/L12 und u.U. L5 kommen mit mehreren Kopien/Untereinheit vor. Die übrigen aufgeführten Proteine liegen mit einer oder - statistisch gesehen - u.U. mit weniger als einer Kopie/Untereinheit vor. Weiteres s. im Text.

zu erwarten, wenn die Determinante in einer für das Immunglobulin zugänglichen - und deshalb zur Oberfläche zu rechnenden relativ großen - Einstülpung des Ribosoms liegt und dadurch der gebundene IgG-Antikörper an seiner zweiten noch freien Valenz zur Anlagerung an ein anderes Ribosom räumlich blockiert ist. In diesem Fall sollte aber der Nachweis der Komplexe im Gradienten nicht möglich sein, weil Komplexe und freie Ribosomen nahezu gleich sedimentieren dürften.

### c. Degradationsprodukte

Es ist denkbar, daß Ribosomen durch die Reaktion mit Antikörpern gegen Einzelproteine degradiert werden, zumal frühere Versuche mit Antiseren gegen intakte Untereinheiten ergaben, daß ribosomale Untereinheiten durch hohe Konzentrationen der Antiseren in ihrer strukturellen Integrität zerstört werden (Zeichhardt, 1974). Die Antikörper gegen Einzelproteine könnten entweder im einfachsten Fall jeweils ihre homologen Proteine aus den Ribosomen herauslösen oder aber Effekte wie zusätzliche Dissoziation heterologer Proteine oder vollständige Desintegration des Ribosoms hervorrufen (Abb. 12e). Die Sedimentationsstudien dieser Arbeit ergaben, daß unter den gewählten Testbedingungen Zerfallsprodukte nur äußerst selten auftreten:

Bei den Versuchen mit unmarkierten Ribosomen wurden keine derartigen Produkte gebildet. Das war aus folgenden Beobachtungen zu schließen: 1. In keinem Experiment traten diskrete Gipfel mit Partikeln auf, die langsamer als Ribosomen-Monomere sedimentierten. 2. Die Basislinien im Gradientenabschnitt für leichtere Partikel als Ribosomen-Monomere waren in keinem Fall signifikant erhöht. 3. Im Vergleich zu Ribosomen-NIS-IgG-Ansätzen war kein Material nachzuweisen, das zusätzlich am Meniskus der Gradienten oder zusammen mit IgG-Antikörpern aufgetrennt wurde.

Dasselbe traf im allgemeinen für die Studien mit  $^3\text{H}$ -markierten, dissoziierten Ribosomen zu. Nur in zwei Fällen konnten radioaktiv markierte Komponenten nachgewiesen werden, die langsamer als 30S-Monomere sedimentierten. Inkubation mit Anti-S5 führte zu 8S-Produkten, mit Anti-S11 zu 16S-Produkten. Die nächstliegende Interpretation ist, daß es sich dabei um verschieden stark vernetzte Protein-Antikörper-Komplexe handelt.

### d. Intraribosomale Vernetzungsprodukte

Voraussetzung für das Auftreten solcher Produkte (Abb. 12f) ist das Vorliegen von mindestens zwei identischen zugänglichen antigenen Determinanten, die gerade so weit voneinander entfernt sind, daß sie gleichzeitig von einem

bivalenten IgG-Antikörper mit seinen identischen Antigenbindungsbereichen besetzt werden können.

Nur unter folgenden Bedingungen könnten identische Determinanten an der Ribosomenoberfläche erreichbar sein: 1. Ein Einzelprotein hat identische Aminosäuresequenz-Bereiche, die gleiche antigene Determinanten bilden. 2. Verschiedene Proteine weisen jeweils identische Sequenz-Bereiche und somit gleiche Determinanten auf. 3. Ein Protein kommt mit mehreren Kopien im Ribosom vor. Da für die ribosomalen Proteine nur sehr wenige Sequenz-Homologien bekannt sind (zur Übersicht s. Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974), sind die ersten beiden Möglichkeiten als äußerst unwahrscheinlich anzusehen. Auch der dritte Fall sollte selten zutreffen, weil Untersuchungen über die stöchiometrischen Verhältnisse ribosomaler Proteine *in situ* zeigten, daß nur die SOS-Proteine L7/L12 mit Sicherheit in mehreren Kopien/Untereinheit vorliegen (s. den folgenden Abschnitt I.3.2. und Tabellen 19 u. 20).

Die Auswertung der Gradientenprofile ergab keine Anzeichen für intraribosomale Vernetzungsprodukte.

#### I.3.2. Proteinstöchiometrie und Proteinzugänglichkeit

Die stöchiometrischen Verhältnisse der Proteine im Ribosom wurden von mehreren Arbeitsgruppen bestimmt (Voynow und Kurland, 1971; Weber, 1972; Hardy, 1975). Die beiden erstgenannten Untersuchungen ergaben, daß - statistisch gesehen - mehrere Proteine mit jeweils einer Kopie/30S bzw. 50S Untereinheit (= "unit proteins") und einige mit deutlich weniger als einer Kopie/Subpartikel (= "fractional proteins") vorkommen (Tabellen 19 u. 20). Proteine, die keiner dieser beiden Gruppen zugeordnet werden konnten, weil ihre stöchiometrischen Werte zwischen denen der "unit" und "fractional proteins" lagen, wurden "marginal proteins" genannt. Weber (1972) ermittelte einige SOS-Proteine, die mit je zwei Kopien in der Untereinheit sind (= "repeated proteins"). Proteine mit relativen Anteilen zwischen denen der "unit" und "repeated proteins" wurden als "fractional repeated proteins" klassifiziert.

Die uneinheitliche Proteinverteilung in den ribosomalen Untereinheiten ließ ein Bild heterogen aufgebauter Ribosomen entstehen. Diese strukturelle Heterogenität führte zu der Annahme, daß die Ribosomen je nach ihrer Proteinzusammensetzung für bestimmte Schritte des ribosomalen Funktionszyklus determiniert sind (Kurland et al., 1969; Voynow und Kurland, 1971). Es wurden zwei Modelle vorgeschlagen: 1. Die Ribosomen bilden in Abhängigkeit ihrer



Tabelle 19. Vergleich der quantitativen Zugänglichkeitsresultate mit den stöchiometrischen Daten für die Proteine in 30S Untereinheiten

| Protein | Stöchiometrische Daten   |               |             |               | Zugänglichkeit für Antikörper<br>% maximale Reduktion des<br>30S-Monomeren-Gipfels<br>salzgewaschener<br>diss. Rib. isol. 30S |           |           |          |       |
|---------|--------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|----------|-------|
|         | Voynow und Kurland, 1971 |               | Hardy, 1975 |               |                                                                                                                               |           |           |          |       |
|         | salzgew.<br>30S          | ungew.<br>30S | Class.      | ungew.<br>30S |                                                                                                                               | Class.    |           |          |       |
| S1      | 0,22                     | 0,95          | F           | 0,10          | F                                                                                                                             | 0,28      | M         | 27, 36 a | 10-20 |
| S2      | 0,51                     | 0,97          | F           | 0,38          | F                                                                                                                             | 0,76-0,96 | U         | 63       | 60-70 |
| S3      | 0,74                     | 0,88          | M           | 0,73          | M                                                                                                                             | 0,78-1,12 | U         | 42       | 30-40 |
| S4      | 0,88                     | 1,09          | U           | 1,20          | U                                                                                                                             | 1,0       | U         | 5        | 80    |
| S5      | 0,80                     | -             | M           | 1,10          | U                                                                                                                             | 0,81-1,06 | U         | 64       | 60-70 |
| S6      | 0,80                     | -             | M           | 0,10          | F                                                                                                                             | 0,89-1,03 | U         | 51       | 30-40 |
| S7      | 0,81                     | 0,91          | U           | 1,03          | U                                                                                                                             | 0,85      | U         | 63       | 30-40 |
| S8      | 0,90                     | 0,99          | U           | 0,95          | U                                                                                                                             | 0,90-1,03 | U         | 28       | 20-30 |
| S9      | 0,95                     | 1,00          | U           | -             | (U)                                                                                                                           | -         | -         | 100      | 50    |
| S9+S11  | -                        | -             | -           | 1,45          | (U+F)                                                                                                                         | 1,39-2,00 | U+U od. M | -        | -     |
| S10     | 0,75                     | 0,92          | M           | 0,55          | F                                                                                                                             | 0,72-1,10 | U         | 25       | 70    |
| S11     | 0,40                     | -             | F           | -             | (F)                                                                                                                           | -         | -         | 20       | 60-70 |
| S12     | -                        | -             | -           | 0,20          | F                                                                                                                             | 0,63-0,81 | M         | 100      | 40    |
| S13     | -                        | -             | -           | 0,70          | M                                                                                                                             | 0,86-0,93 | U         | 28       | 70    |
| S14     | 0,49                     | 0,59          | F           | 0,40          | F                                                                                                                             | 0,61-0,70 | M         | 43       | 30-40 |



## Fortsetzung: Tabelle 19

| Protein | Stöchiometrische Daten   |               |        |               |          |               | Zugänglichkeit für Antikörper<br>% maximale Reduktion des<br>30S-Monomeren-Gipfels<br>salzgewaschener<br>diss. Rib. isol. 30S |           |
|---------|--------------------------|---------------|--------|---------------|----------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|         | Voynow und Kurland, 1971 |               |        | Weber, 1972   |          | Hardy, 1975   |                                                                                                                               |           |
|         | salzgew.<br>30S          | ungew.<br>30S | Klass. | ungew.<br>30S | Klass.   | ungew.<br>30S |                                                                                                                               | Klass.    |
| S15     | -                        | -             | -      | )             | (U)      | )             | 38                                                                                                                            | 30-40     |
| S16     | 0,89                     | -             | U      | )             | 3,00 (U) | )             | 2,04-2,49                                                                                                                     | 33<br><30 |
| S17     | 0,87                     | -             | U      | )             | (U)      | )             | U                                                                                                                             | -         |
| S18     | 0,73                     | 0,77          | M      | 0,33          | F        | 0,74-1,03     | 15                                                                                                                            | 70-80     |
| S19     | 0,58                     | 0,48          | F      | 0,47          | F        | 0,85-0,97     | 38                                                                                                                            | 50-60     |
| S20     | 0,55                     | 0,46          | F      | 0,80          | U        | 0,80-0,95     | 74                                                                                                                            | 80        |
| S21     | 0,33                     | 0,37          | F      | 0,12          | F        | 0,66-0,80     | 60                                                                                                                            | 30-40     |

Legende s. S. 116.

Legende s. S. 116.

Tabelle 20. Vergleich der quantitativen Zugänglichkeitsresultate mit den stöchiometrischen Daten für die Proteine in 50S Untereinheiten

| Protein  | Stöchiometrische Daten |                      |            | Zugänglichkeit für Antikörper              |                     |
|----------|------------------------|----------------------|------------|--------------------------------------------|---------------------|
|          | Weber, 1972            | Hardy, 1975          |            | % maximale Reduktion des Monomeren-Gipfels | salzgewaschener 50S |
|          | ungew. 50S             | Klass.               | ungew. 50S | Klass.                                     |                     |
| L1       | 1,10                   | U                    | 1,00       | U                                          | 80                  |
| L2       | 0,90                   | U                    | 0,95-1,07  | U                                          | 70                  |
| L3       | 1,40                   | FR                   | 0,69-0,80  | U                                          | 20-30               |
| L4       | 0,90                   | U                    | 0,68-0,76  | U                                          | 20                  |
| L5       | 1,43, 1,80             | FR, R                | 0,91-1,14  | U                                          | 30                  |
| L6       | 1,15                   | U                    | 1,00-1,06  | U                                          | >20                 |
| L7       | 1,70                   | FR                   | 1,36-1,58  | -                                          | -                   |
| L7/L12§) | 2,10                   | R                    | -          | R                                          | 60                  |
| L8       | } 1,40                 | (F+F) <sup>od.</sup> | -          | -                                          | 40-50               |
| L9       |                        | (F+U)                | 0,29-0,32  | M                                          | 20-30               |
| L10      | 0,95                   | U                    | 0,82-0,91  | U                                          | 60                  |
| L11      | 1,15                   | U                    | 0,71-0,73  | M                                          | 40                  |
| L12      | 0,30                   | F                    | 1,54-1,71  | -                                          | -                   |
| L13      | 1,40                   | FR                   | 1,01-1,14  | U                                          | 10-20               |
| L14      | 0,80                   | U                    | 0,72-0,83  | U                                          | 60-70               |
| L15      | -                      | (U)                  | 1,16-1,19  | U                                          | 30                  |
| L16      | 0,80                   | U                    | 0,54-0,67  | M                                          | 60                  |
| L17      | 1,20                   | U                    | 0,90-1,00  | U                                          | 60-70               |

## Fortsetzung: Tabelle 20

| Protein | Stöchiometrische Daten |        |             |         | Zugänglichkeit für Antikörper<br>% maximale Reduktion des<br>Monomeren-Gipfels<br>salzgewaschener 50S |
|---------|------------------------|--------|-------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | Weber, 1972            |        | Hardy, 1975 |         |                                                                                                       |
|         | ungew. 50S             | Klass. | ungew. 50S  | Klass.  |                                                                                                       |
| L18     | 2,18                   | R      | 0,81-0,96   | U       | <20                                                                                                   |
| L19     | 1,05                   | U      | 1,03-1,21   | U       | 70                                                                                                    |
| L20     | -                      | (F)    | -           | -       | 30                                                                                                    |
| L21     | 0,85                   | U      | 1,32-1,33   | U od. R | 20                                                                                                    |
| L22     | 1,65, 2,00             | FR, R  | 0,90-1,04   | U       | 30                                                                                                    |
| L23     | 1,20                   | U      | 0,99-1,01   | U       | 70                                                                                                    |
| L24     | 1,60                   | FR     | 0,74-Q90    | U       | 30-40                                                                                                 |
| L25     | 1,40                   | FR     | 1,01-1,06   | U       | 50-60                                                                                                 |
| L26     | 0,20                   | F      | 0,69-Q80    | M       | 60                                                                                                    |
| L27     | 0,75                   | M      | 1,01-1,06   | U       | <50                                                                                                   |
| L28     | 0,45                   | F      | 0,68-0,83   | M       | 10-20                                                                                                 |
| L29     | 1,10                   | U      | 0,73        | M       | 40-50                                                                                                 |
| L30     | 0,90                   | U      | 0,65-0,73   | M       | 40-50                                                                                                 |
| L31     | -                      | (F)    | -           | -       | 50                                                                                                    |
| L32     | 0,60                   | F      | 0,74        | M       | 30                                                                                                    |
| L33     | 0,50                   | F      | 0,71-0,84   | U       | 20-30                                                                                                 |
| L34     | -                      | (F)    | -           | -       | 10                                                                                                    |

Legende s. S. 116.

Legende zu den Tabellen 19 und 20:

Die von Voynow und Kurland (1971) ermittelten stöchiometrischen Daten sind Durchschnittswerte aus Untersuchungen, die mit der "Molar Recovery"-Methode und "Isotope Dilution"-Technik durchgeführt wurden. Die Daten von Weber (1972) wurden mit Hilfe der "Molar Recovery"-Methode, die von Hardy (1975) mittels der "Isotope Dilution"-Technik bestimmt. Die Untersuchungen von Hardy wurden als einzige an undissoziierten 70S Ribosomen und nicht an isolierten Subpartikeln vorgenommen.

Die Proteinzugänglichkeitsdaten sind Tabelle 3 (isolierte 30S Untereinheiten), Tabelle 4 (isolierte 50S Untereinheiten) und Tabelle 8 (dissoziierte Ribosomen) entnommen.

F = "fractional protein": zwischen 0,1 und 0,6 Kopien/Untereinheit

M = "marginal protein": zwischen 0,6-0,65 und 0,75 Kopien/Untereinheit

U = "unit protein": zwischen 0,75-0,8 und 1,2-1,25 Kopien/Untereinheit

FR = "fractional repeated protein": zwischen 1,4 und 1,7 Kopien/Untereinheit

R = "repeated protein": zwischen 1,8 und 2,2 Kopien/Untereinheit

(Die Intervalle sind von den einzelnen Autoren nicht in jedem Fall vollkommen identisch gewählt worden.)

a) ungewaschene Ribosomen

§) Für L7/L12 sind weiterhin 3 bzw. 4 Kopien/50S Untereinheit ermittelt worden (Thammana et al., 1973; Subramanian, 1975).

Proteinzusammensetzung verschiedene Gruppen, die permanent für jeweils eine Teilfunktion zuständig sind. 2. Die Ribosomen durchlaufen verschiedene Funktionszustände, wobei Proteine je nach Funktion dissoziieren oder assoziieren. Einige funktionelle Untersuchungen, bei denen intakte Ribosomen unter Rekonstitutionsbedingungen mit jeweils einem bzw. einer Auswahl der "fractional proteins" inkubiert und dadurch zu einzelnen Funktionsschritten befähigt wurden (s. Abschnitt 3.1.c der Einleitung; zur Übersicht s. Kurland et al., 1972a), schienen die Heterogenität und ihre physiologische Bedeutung (Modell 2) zu bestätigen.

Die kürzlich durchgeführten Untersuchungen von Hardy (1975) ließen jedoch auf Ribosomen mit einem wesentlich homogeneren Aufbau schließen. Nach Hardy liegt die überwiegende Mehrzahl der Proteine als "unit proteins" in ihrer entsprechenden Untereinheit vor (Tabellen 19 u. 20). Kein Protein wurde als "fractional" und nur wenige Proteine wurden als "marginal" klassifiziert. Lediglich L7/L12 wurden als "repeated proteins" eingestuft.

Mehrere Kopien von L7/L12 im Ribosom sind von insgesamt fünf Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (Möller et al., 1972; Weber, 1972; Thammana et al., 1973; Hardy, 1975; Subramanian, 1975). Es wurden Werte zwischen 2 und 4 Kopien der beiden Proteine/50S Untereinheit ermittelt. L7/L12 können folglich mit Sicherheit als "repeated proteins" klassifiziert werden.

Als abgesichert kann weiterhin die Stöchiometrie derjenigen Proteine angesehen werden, die in allen Untersuchungen als "unit proteins" bestimmt wurden (Tabellen 19 u. 20). Für alle übrigen Proteine ist noch keine endgültige Entscheidung über ihr stöchiometrisches Verhältnis im Ribosom möglich. Vor allem für die Proteine, die im Gegensatz zu Hardy von Voynow und Kurland sowie von Weber als "fractional" oder "marginal" eingestuft worden sind, dürfte jedoch erwartet werden, daß die meisten in Wirklichkeit "unit proteins" sind: Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die nachweisbare Proteinmenge von der Art der Ribosomenaufarbeitung und Proteinextraktion abhängig sein kann (Voynow und Kurland, 1971; Hardy, 1975). Beispielsweise enthalten Ribosomen, die bei hohen Salzkonzentrationen gewaschen sind, gegenüber ungewaschenen Ribosomen einen partiell verminderten Proteinanteil (Tabelle 19). Der nächstliegende und wichtigste Grund für die abweichenden Stöchiometriewerte dieser Proteine ist folglich in unterschiedlichen Präparationsmethoden bei den einzelnen Untersuchungen zu vermuten. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die

Proteinzusammensetzung der Ribosomen je nach Wachstumsbedingung der Bakterien, d.h. in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und von reichem oder armem Nährmedium, variieren kann (Deusser, 1972; Deusser und Wittmann, 1972; Ramagopal und Subramanian, 1974, 1975).

Es stellte sich die Frage, ob die quantitativen Daten der Proteinzugänglichkeit für Antikörper an der Ribosomenoberfläche die Proteinstöchiometrie widerspiegeln. Danach hätten Antikörper gegen "unit" oder "repeated proteins" stärker mit ihren entsprechenden Untereinheiten reagieren sollen als Immunglobuline gegen "fractional proteins". Die Korrelation der Proteinstöchiometrie mit den quantitativen Zugänglichkeitsdaten (es wurde jeweils ausschließlich der Reduktionseffekt auf den Ribosomen-Monomeren-Gipfel berücksichtigt) ergab jedoch keine generelle Übereinstimmung (Tabellen 19 u. 20). Es zeigte sich vielmehr folgendes: Die Mehrzahl der Antikörperpräparationen gegen "marginal", "unit" und "repeated proteins" reagierte selbst bei Konzentrationen, die zu maximaler Reduktion des Ribosomen-Monomeren-Gipfels führte, schwächer, als der stöchiometrische Anteil des jeweiligen Proteins erwarten ließ (Tabellen 19 u. 20). Als typisches Beispiel ist das Ergebnis für Protein L19 heranzuziehen: L19 liegt mit einer Kopie/50S Untereinheit vor, Anti-L19 reduzierte aber den Monomeren-Gipfel nicht komplett, sondern lediglich partiell um maximal 70%. Entsprechendes gilt für L7/L12, die mit 2-4 Kopien in der 50S Subpartikel vorkommen; der Reduktionseffekt durch Anti-L7/L12 lag nur bei 60%. Außer für die Proteine S9 und S12 in dissoziierten 70S Ribosomen wurden im übrigen durchweg partielle Reduktionen nachgewiesen.

Als Hauptgründe für diese im Vergleich zur Stöchiometrie zu niedrigen Zugänglichkeitsdaten sind zu berücksichtigen: 1. Wie noch ausgeführt wird, ist mit Hilfe der Sedimentationsmethode der Nachweis aller gebildeten Ribosomen-Antikörper-Komplexe nicht möglich (s. Abschnitt I.3.4.a). Das sollte im wesentlichen darauf beruhen, daß das Gleichgewicht der Antigen-Antikörper-Reaktion durch die Auftrennung des Reaktionsgemisches bei der Zentrifugation gestört wird. Im übrigen kann nicht davon ausgegangen werden, daß die in Abschnitt I.3.1.2. und Abbildung 11 zusammengefaßten Bedingungen für die Zugänglichkeit der Proteine an der Ribosomenoberfläche und ihre Reaktivität mit Antikörpern stets erfüllt werden. 2. Im Gegensatz zu den stöchiometrischen Untersuchungen wurden bei den immunologischen Experimenten die Ribosomen salzgewaschen und sollten folglich in ihrem Proteinanteil partiell vermindert sein (s.o.).



Einige Antikörper gegen Proteine, die von Voynow und Kurland bzw. von Weber als "fractional" oder "marginal proteins" bestimmt wurden, reagierten dagegen mit ihren entsprechenden Untereinheiten wesentlich stärker als die stöchiometrische Klassifikation des jeweiligen Proteins erwarten ließ (in isolierten 30S Untereinheiten: S11, S20; in dissoziierten Ribosomen: S12, S21; in 50S Untereinheiten: L26; s. Tabellen 19 u. 20)<sup>\*)</sup>. Da der Grad der Reduktion des Ribosomen-Monomeren-Gipfels durch Antikörper jedoch nicht stärker sein kann, als dem relativen Anteil des entsprechenden Proteins im Ribosom entspricht, konnte gefolgert werden, daß die von den Autoren angegebenen stöchiometrischen Werte für die Proteine S11, S12, S20, S21 und L26 zu niedrig liegen dürften. Die von Hardy bestimmten Werte sind folglich als wahrscheinlicher anzusehen.

Nur für wenige Proteine (z.B. S1 und L9) waren alle stöchiometrischen Werte und der Grad der Ribosomen-Antikörper-Reaktion übereinstimmend niedrig (Tabellen 19 u. 20). Daraus konnte jedoch keine Bestätigung für die geringen stöchiometrischen Anteile der beiden Proteine abgeleitet werden: Der Verlust beider Proteine bei der Ribosomenisolierung und Proteinextraktion ist beträchtlich (Hardy, 1975). Aus diesem Grunde klassifizierte Hardy diese beiden Proteine trotz ihrer niedrigen stöchiometrischen Werte als zumindest "marginal".

### I.3.3. Die Reaktivität der 30S-ribosomalen Proteine in isolierten 30S Untereinheiten und dissoziierten Ribosomen

Zum Nachweis der Proteinzugänglichkeit in den ribosomalen Untereinheiten wurden im allgemeinen isolierte Subpartikel verwendet. Nur in Vorversuchen mit Antikörpern gegen 30S-Einzelproteine wurden Gemische beider Untereinheiten in Form dissoziierter Ribosomen untersucht (s. Abschnitt I.2.5.). Obwohl die Experimente mit den dissoziierten Ribosomen und 30S Untereinheiten nicht für einen direkten Vergleich vorgesehen waren, soll dennoch gefragt werden, ob Antikörper unterschiedlich reagieren, wenn sie einerseits mit isolierten 30S Subpartikeln und andererseits mit den 30S Partikeln dissoziierter Ribosomen inkubiert werden.

---

<sup>\*)</sup> Die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse mit isolierten 30S Untereinheiten und dissoziierten Ribosomen werden in Abschnitt I.3.3. behandelt.

Nur für 9 Proteine konnten die Ergebnisse für eine Korrelation herangezogen werden (Tabelle 21). Lediglich für diese Proteine standen bei beiden Versuchsserien dieselben Antikörperpräparationen zur Verfügung und wurden jeweils gleiche Konzentrationsverhältnisse zwischen Antigen und Antikörper gewählt (s. Tabellen 3 u. 8). Selbst diese Resultate waren jedoch nur unter Vorbehalt vergleichbar, weil Unterschiede in den Versuchsbedingungen bestanden: Es wurden verschieden präparierte Ribosomen verwendet; darüber hinaus wichen die Salzkonzentrationen in den Rohrzucker-Dichtegradienten voneinander ab (s. "Materialien und Methoden"). Somit ist es nicht verwunderlich gewesen, daß nur für drei Proteine (S4, S8 und S15) gleichstarke Reaktionen auftraten, wie der Vergleich der Ribosomen-Monomeren-Reduktion widerspiegelt (Tabelle 21). Im übrigen könnten die abweichenden Bedingungen bei beiden Untersuchungen auch dafür verantwortlich sein, daß - im Gegensatz zu den isolierten Subpartikeln - die 30S Untereinheiten der dissoziierten Ribosomen bei der Inkubation mit Antikörpern keine Dimere bildeten.

Es ist offensichtlich, daß aus diesen Untersuchungen keine Folgerungen über einen etwaigen Einfluß der 50S Subpartikel auf die Reaktivität der

Tabelle 21. Reduktionseffekt jeweils derselben Antikörperpräparation bei gleicher IgG-Konzentration auf den 30S-Monomeren-Gipfel dissoziierter Ribosomen bzw. isolierter 30S Untereinheiten

| Antikörper<br>gegen<br>Protein | % Restmenge unter 30S-Monomeren-Gipfel |                |
|--------------------------------|----------------------------------------|----------------|
|                                | diss. Ribosomen                        | isolierter 30S |
| S2                             | 37                                     | 90-100         |
| S4                             | 95                                     | 100            |
| S5                             | 36                                     | 60-70          |
| S6                             | 49                                     | 60-70          |
| S8                             | 80                                     | 70-80          |
| S12                            | 0                                      | 90             |
| S15                            | 62                                     | 60-70          |
| S16                            | 67                                     | 100            |
| S18                            | 85                                     | 100            |

Die Daten sind den Tabellen 3 und 8 entnommen.

30S Subpartikel mit Antikörpern möglich waren. Bedingt durch die nur ungenügende Übereinstimmung der Resultate beider Versuchsserien konnten die Ergebnisse mit dissoziierten Ribosomen auch nicht für jene quantitative Korrelation der Proteinzugänglichkeit in freien Untereinheiten und undissoziierten 70S Ribosomen herangezogen werden, die Aufschluß über Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich bringen sollte (s. Abschnitt I.2.6.2.).

Es zeigt sich also, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen die Experimente mit dissoziierten Ribosomen und Antikörpern gegen 30S-Einzelproteine einzig und allein Aussagen über das Vorliegen einiger 30S-Proteine in der 50S Untereinheit zulassen (s. Abschnitt I.2.5.). Vergleichende Studien mit isolierten Subpartikeln und dissoziierten Ribosomen unter jeweils identischen Bedingungen wären vor allem dann durchzuführen, wenn festgestellt werden soll, ob und in welchem Maße die Reaktivität der Untereinheiten aufgrund eines möglichen partiellen Proteinverlustes bei der Untereinheitenisolierung verändert wird. Obwohl Subpartikel in isoliertem Zustand einen verminderten Proteinanteil aufweisen können (s. Hardy, 1975), ist ihre Verwendung stets vorzuziehen, wenn außer dem Grad der Monomeren-Reduktion auch der Anteil an den einzelnen Reaktionsprodukten zu bestimmen ist; eine Überlagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit der Schwesteruntereinheit im Dichtegradienten, wie sie bei den Experimenten mit dissoziierten Ribosomen auftreten kann, ist hierbei ausgeschlossen.

#### I.3.4. Einschränkungen bei der Versuchsinterpretation

##### a. Thermodynamischer Gesichtspunkt

Die Versuche zur Bestimmung der Proteinzugänglichkeit im Ribosom sind unter Bedingungen des Ungleichgewichts durchgeführt worden: Durch Konzentrationsänderung und hydrodynamischen Druck bei der Auftrennung der Reaktionsgemische im Schwerfeld der Ultrazentrifuge wird das bei der Inkubation von Ribosomen mit Antikörpern sich einstellende Gleichgewicht zwischen den Antigen-Antikörper-Komplexen und den freien Reaktionspartnern gestört; dadurch bleiben nicht alle bei der Inkubation gebildeten Reaktionsprodukte erhalten. Da die Antikörper einer Immunglobulinpopulation unterschiedlich starke Aviditäten aufweisen können (zur Übersicht s. Eisen, 1973), ist anzunehmen, daß nur solche Ribosomen-Antikörper-Komplexe separiert werden, deren vernetzende Antikörper ausreichende Avidität besitzen, um während der Zentrifugation nicht vom Antigen zu dissoziieren.

Es wäre von Bedeutung, für ausgewählte Antikörperpräparationen mit verschiedenen Reaktionseigenschaften einige thermodynamische Parameter der Ribosomen-Antikörper-Reaktion wie z.B. die Gleichgewichtskonstante und die "freie Energie" ( $\Delta G^0$ ) zu bestimmen. Da für mehrere in der Literatur beschriebene Hapten-Antikörper-Systeme Gleichgewichtskonstanten zwischen minimal  $4 \times 10^3 - 1 \times 10^5$  l/Mol und maximal  $1 \times 10^9$  l/Mol gemessen sowie Werte für  $\Delta G^0$  zwischen -6000 und -11000 cal/Mol ermittelt wurden (zur Übersicht s. Eisen, 1973), ist anzunehmen, daß die Werte für Ribosomen-Antikörper-Systeme ebenfalls in diesen Bereichen liegen. Die experimentelle Bestimmung dieser Größen mit Hilfe der in dieser Arbeit angewendeten Methode wurde nicht vorgenommen. Sie wäre aufgrund einiger Einschränkungen auch nur bedingt möglich gewesen: Selbst wenn man von der zuvor erwähnten Gleichgewichtsverschiebung bei der Zentrifugation absieht, sind bereits Untersuchungen über die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion, bei denen entweder ausschließlich die Antikörperkonzentrationen (s. Abschnitt I.2.4.1.), die Antigenkonzentrationen oder aber die Anteile beider Partner verändert werden, praktisch Grenzen gesetzt. Von bestimmten molaren Verhältnissen an könnten bisher nicht nachgewiesene Verunreinigungen der Antikörperpräparationen zur Wirkung kommen. Zur Verdeutlichung dieses Problems wird auf Abbildung 6 verwiesen. Eine signifikante Reduktion des Ribosomen-Monomeren-Gipfels um mindestens 10% tritt in der Regel zwischen 0,3 und 4 "IgG-Konzentrationseinheiten" auf. Da aufgrund der Nachweisgrenze bei der Immunglobulincharakterisierung die einzelproteinspezifischen Antikörper maximal 3% verunreinigende Aktivität gegen ein nichthomologes Protein enthalten könnten, sollten im Test maximal nur 10 "IgG-Konzentrationseinheiten" eingesetzt werden. Durch Verunreinigungen hervorgerufene Reduktionseffekte von >10% dürften damit im wesentlichen auszuschließen sein. Voraussetzung für diese Annahme ist jedoch, daß die jeweilige Avidität der homologen und verunreinigenden Antikörper etwa gleich ist. Da dies nicht in jedem Fall zutreffen muß, wurden in dieser Arbeit derart hohe Antikörperkonzentrationen (10 "Einheiten") nur in Ausnahmefällen verwendet. Im allgemeinen wurden 3-4 "IgG-Konzentrationseinheiten" getestet. Um jegliche Verunreinigung einer Antikörperpräparation auszuschalten, würde sich entweder eine spezifische Anreicherung mit dem homologen antigenen Protein oder eine Absättigung mit nichthomologen Proteinen anbieten (s. Tischendorf und Stöffler, 1975).

Auch die Temperaturabhängigkeit der Reaktion ließe sich nicht ohne weiteres ermitteln, weil in bestimmten Temperaturbereichen beide Partner in ihrer

strukturellen Integrität verändert werden und folglich unterschiedlich reaktiv sein könnten. So ist bekannt, daß Ribosomen bei  $60^{\circ}\text{C}$  (Miskin et al., 1970) und IgG-Antikörper bei  $70^{\circ}\text{C}$  (s. Eisen, 1973) denaturiert werden. Außerdem wurde beschrieben, daß Ribosomen bei Temperaturen zwischen  $0-40^{\circ}\text{C}$  unterschiedliche Konformationen aufweisen können; durch Hitzebehandlung bei bestimmten Salzbedingungen gehen in funktionell inaktiven Ribosomen Konformationsänderungen vonstatten, wodurch die Ribosomen reaktiviert werden (Miskin et al., 1970; Zamir et al., 1971; zur Übersicht s. Zamir et al., 1974).

Alle Experimente dieser Arbeit wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Es ist zu vermuten, daß z.B. eine Temperaturerhöhung die Antigen-Antikörper-Reaktion nicht gefördert hätte: In der Literatur wurde für mehrere Hapten-Antikörper-Systeme gezeigt, daß die Reaktionen in einigen Fällen exotherm, in anderen isotherm verlaufen (s. Eisen et al., 1973). Temperaturerhöhungen würden folglich für eine exotherme Reaktion eine Erniedrigung der Gleichgewichtskonstante, für eine isotherme Reaktion dagegen keine Veränderung der Konstante bewirken. Bislang ist kein endothermes Hapten-Antikörper-System bekannt, bei dem mit einer Erhöhung der Temperatur eine Erhöhung der Gleichgewichtskonstante einhergeht.

Schließlich würde sich auch bei der Untersuchung der Salzabhängigkeit der Ribosomen-Antikörper-Reaktion mit einiger Sicherheit herausstellen, daß dieses System zur Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung nur bedingt geeignet ist. Während niedrige Konzentrationen von monovalenten Kationen und von  $\text{Mg}^{++}$  Ribosomen in ihrer Konformation verändern und dadurch inaktivieren (Miskin et al., 1970; Zamir et al., 1971; Ginzburg und Zamir, 1975; zur Übersicht s. Zamir et al., 1974), führen sehr hohe Konzentrationen monovalenter Kationen zur Dissoziation mehrerer Proteine vom Ribosom (für Referenzen s. Abschnitt 3.1.b der Einleitung). Es ist offensichtlich, daß nach dem Ablösen dieser sogenannten "Split Proteine" die verbleibenden "Core Partikel" gegenüber intakten Ribosomen eine unterschiedliche Reaktivität mit Antikörpern aufweisen dürften.

#### b. Die Inhomogenität der verwendeten Ribosomen

Die getesteten Ribosomenpräparationen enthielten keine einheitlichen Populationen:

1. Funktionelle Untersuchungen ergaben, daß nur eine relativ kleine



Ribosomenfraktion einer gegebenen Population im In vitro-Proteinsynthesystem funktionell aktiv ist (Gilbert, 1963). Geht man davon aus, daß - wie von Zamir und Mitarbeitern gefolgert und bereits zuvor angeführt - dem Funktionsverlust der Ribosomen eine Konformationsänderung in den Partikeln zugrunde liegt (zur Übersicht s. Zamir et al., 1974), so geben die quantitativen Zugänglichkeitsdaten unter Umständen keine einheitliche Proteinerreichbarkeit im Ribosom wieder. Falls die aktiven und inaktiven Ribosomen voneinander unterschiedliche Zugänglichkeiten der antigenen Determinanten aufwiesen, würden die quantitativen Daten Additionswerte für mehr als einen Ribosomentyp sein. Für weitere Versuche sollten deshalb nach Zamir et al. (1974) hitzeaktivierte Ribosomen verwendet werden, wobei man sich jedoch vergegenwärtigen muß, daß diese Behandlung sicherlich nur einen Teil der Ribosomen reaktiviert. Folglich würden auch unter diesen Bedingungen nicht alle Ribosomen mit einheitlichen Konformationen vorliegen.

2. Studien mit 70S Ribosomen zeigten, daß Ribosomen, die nicht an der Proteinbiosynthese teilnehmen, also nicht mit einer wachsenden Peptidkette beladen sind (sog. "vacant" Ribosomen), sich aus zwei verschiedenen Typen zusammensetzen (zur Übersicht s. Noll et al., 1973). In Abhängigkeit von der verwendeten  $Mg^{++}$ -Konzentration und einer bestimmten kritischen Ultrazentrifugationsgeschwindigkeit lassen sich bei der Ribosomenisolierung über Dichtegradienten 68S Partikel, sogenannte "tight couples", von 57S Partikeln abtrennen, die als "loose couples" bezeichnet werden. Im Gegensatz zu den "tight couples" dissoziieren die "loose couples" bereits bei 5 mM  $Mg^{++}$  und sind bei der Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Synthese um weniger als die Hälfte aktiv. Diese Unterschiede sind auf veränderte 50S Subpartikel in den "loose couples" zurückzuführen. Es ist wiederum nicht auszuschließen, daß diese beiden Ribosomentypen die antigenen Determinanten ihrer Proteine teilweise unterschiedlich erreichbar haben.

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten undissoziierten 70S Ribosomen wurden unter Bedingungen isoliert, unter denen die Ribosomen überwiegend als "tight couples" vorliegen. Eine quantitative Trennung der "tight" von den "loose couples" wurde nicht vorgenommen.

3. Uneinheitliche Ribosomenpopulationen könnten schließlich auch auf eine heterogene Proteinzusammensetzung der Ribosomen zurückzuführen sein (s. Abschnitt 1.3.2.). Diese Erklärung sollte dann zutreffen, wenn für bestimmte Einzelproteine mit Sicherheit feststeht, daß sie nicht mit einem



stöchiometrischen Verhältnis von jeweils 1 Kopie/Ribosom bzw. einem ganzzahligen Vielfachen davon im Ribosom vorliegen.

### c. Effekte der Antikörper auf der Konformation von Ribosomen

Antigen-Antikörper-Reaktionen können Konformationsänderungen in den gebundenen Antikörpern und/oder Antigenen bewirken (Cellada und Strom, 1972). In Antikörpern gegen Polymere von D-Alanin wird durch die Interaktion mit dem entsprechenden Hapten eine Volumenkontraktion hervorgerufen (Pilz et al., 1973). Ebenso sind Konformationsänderungen in Antigenen bekannt: Beispielsweise verändern gegen Apomyoglobin gerichtete Antikörper durch ihre Anlagerung an Metmyoglobin das Antigen derart, daß die prosthetische Häm-Gruppe vom Protein dissoziiert (Crumpton, 1972). Antikörper, die für  $\beta$ -Galactosidase spezifisch sind, vermögen inaktives Enzym aus bestimmten Mutantenstämmen durch Bindung zu reaktivieren (Melchers et al., 1972). Diese strukturellen Änderungen im Antigen dürften im Bereich weniger Ångströmeinheiten liegen (Cellada und Strom, 1972).

Selbstverständlich könnten Konformationsänderungen auch in Ribosomen durch die Bindung von Immunglobulinen hervorgerufen werden. In Relation zu den Dimensionen von Ribosom und Antikörper sollten diese Änderungen jedoch als gering einzuschätzen sein, wenn man davon ausgeht, daß die Antikörpereffekte auf die Ribosomen und die in der Literatur untersuchten Antigene jeweils gleich stark sind. Das Ausmaß einer strukturellen Änderung im Ribosom läge demnach in jenem Rahmen, der in Abhängigkeit von der Sauerstoffbeladung für die Unterschiede in der Quartärstruktur von Hämoglobin nachgewiesen wurde (zur Übersicht s. Perutz und TenEyck, 1971; McLachlan et al., 1972; Edelstein, 1975). Es kann also angenommen werden, daß die Ribosomenkonformationen in Antigen-Antikörper-Komplexen und in freien Ribosomen sehr ähnlich sind; somit sollten sich auch die Muster der reaktiven antigenen Determinanten gleichen.

Die folgenden Ergebnisse deuten in der Tat auf Konformationsänderungen im Ribosom durch Antikörper hin. Immunglobuline gegen fünf Proteine (Anti-S2, -S9, -S10, -S20 und -L27) bewirkten bei der Inkubation mit undissoziierten 70S Ribosomen eine partielle Dissoziation der Partikel in ihre Untereinheiten (s. Abschnitt I.2.6.1.). Da die Dissoziationseffekte jedoch nur in diesen wenigen Fällen beobachtet wurden und die auftretenden Untereinheiten dann niemals mehr als 10% der Ausgangskonzentration der eingesetzten 70S Ribosomen ausmachten, ist die Annahme einer nur geringen Änderung im Ribosom berechtigt.

### I.3.5. Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren

#### I.3.5.1. Immunologische Experimente

Folgende weitere immunologische Studien zur Proteinzugänglichkeit im Ribosom wurden in der Arbeitsgruppe "Dr. Stöffler" durchgeführt (zur Übersicht s. Stöffler, 1974):

##### a. Sedimentationsstudien mit der analytischen Ultrazentrifuge

Ähnliche Untersuchungen wie in dieser Arbeit sind mit Hilfe von Sedimentationsgeschwindigkeitsversuchen in der analytischen Ultrazentrifuge (Modell "E" von Beckman) vorgenommen worden (Stöffler et al., 1973; Morrison, 1974; Morrison, Tischendorf, Stöffler und Garrett, unveröffentlichte Ergebnisse). Wie bereits behandelt, sollten bei jenen Zugänglichkeitsstudien vor allem die Sedimentationswerte der Ribosomen-Antikörper-Komplexe (insbesondere der Dimere) genauer bestimmt werden, als es mit der Dichtegradientenzentrifugationsmethode möglich war (s. Abschnitt I.3.1.2.a, S. 107). Der Anteil aller gebildeten Komplexe, d.h. die gesamte nachweisbare Aggregation, wurde - entsprechend dem Reduktionsgrad der Ribosomen-Monomeren-Gipfel bei den Gradientenversuchen - als Maß für die Ribosomen-Antikörper-Reaktion gewertet.

Bei diesen Untersuchungen ließ sich zeigen, daß die überwiegende Mehrzahl der einzelproteinspezifischen Antikörper mit ihren antigenen Proteinen im Ribosom reagiert. Außer S17 und L34, gegen die keine Antikörper getestet wurden, sowie S19 konnten alle Proteine in ihren entsprechenden Untereinheiten als zugänglich bestimmt werden. Bei den Dichtegradientenexperimenten waren S19 und L34 dagegen klar erreichbar (s. Tabellen 3 u. 4).

Es fällt auf, daß Proteine, deren Antikörper bei den Modell "E"-Versuchen nur zu schwachen Reaktionen mit Ribosomen führten (<20% totale Aggregation), bei den Gradientenexperimenten deutlich stärker reagierten (30% und mehr Reduktion des Untereinheiten-Monomeren-Gipfels). Umgekehrt zeigte die analytische Ultrazentrifugation nur für ein Protein (L18) eine eindeutig stärkere Reaktion als bei den Gradientenversuchen. Da jedoch für die beiden Proteinzugänglichkeitsstudien, die im übrigen nicht für eine direkte Korrelation vorgesehen waren, einige unterschiedliche Versuchsbedingungen bestanden, ist eine nur unvollkommene Übereinstimmung verständlich: 1. Mehrere Antikörperpräparationen gegen die einzelnen Proteine stammten aus verschiedenen Tieren; dadurch könnten individualspezifische Unterschiede der Antikörper zum Tragen kommen. 2. Die Viskosität der Medien, in denen die Inkubationsgemische aufgetrennt wurden, und die Gravitationsbedingungen wichen bei beiden Untersuchungen voneinander ab. Berücksichtigt man, daß - wie bereits ausgeführt -

die Avidität der Antikörper selbst in ein und derselben Immunglobulinpräparation nicht einheitlich zu sein braucht (s. Abschnitt I.3.4.a), könnte es aufgrund jeweils unterschiedlichen Reibungswiderstandes und hydrodynamischen Druckes auf die Ribosomen-Antikörper-Komplexe zur Selektion verschiedener Komplexe kommen. 3. Gegenüber den Experimenten der vorliegenden Arbeit mußten schließlich bei den Modell "E"-Versuchen wegen der angewendeten UV-Absorptionsmessung relativ verdünnte Ribosomen-Antikörper-Ansätze getestet werden und ließen sich die Konzentrationsverhältnisse zwischen beiden Partnern nur in begrenztem Maße variieren: Anders als bei den Gradientenversuchen, bei denen die unreaktierten Ribosomen und Antikörper von den Ribosomen-Antikörper-Komplexen vollkommen abgetrennt werden, würde sonst ein verhältnismäßig hoher Anteil an Immunglobulinen die Absorption der Ribosomen bei der erforderlichen Wellenlänge von 260 nm überdecken.

#### b. Immunpräzipitationsexperimente

Immuno-Doppeldiffusionsexperimente: Alle Antiseren gegen die 21 30S-Proteine bildeten bei der Inkubation mit isolierten 30S Untereinheiten in Doppeldiffusionsexperimenten nach Ouchterlony (1958) Präzipitationslinien (Stöffler et al., 1973). Um auszuschließen, daß diese Ergebnisse unter Umständen die Proteinzugänglichkeit von Subpartikeln widerspiegelt, die während der Diffusion strukturell degradiert wurden, testete man in Kontrollexperimenten glutaraldehydfixierte Untereinheiten gegen die Antiseren. Es zeigte sich, daß außer Anti-S15 und -S17 alle Seren reagierten. 19 der 30S-Proteine in situ waren also mittels dieser Methode als zugänglich zu bestimmen. Lediglich für S15 und S17 ließ sich nicht entscheiden, ob ihre an der Partikeloberfläche erreichbaren antigenen Determinanten durch das Aldehyd modifiziert waren oder ob die Fixierung ein Herauslösen von S15 und S17 aus dem Ribosom und damit eine Reaktion mit jeweils freiem Protein verhinderte.

Weniger gut abgesicherte Zugänglichkeitsergebnisse wurden von Hawley und Slobin (1973) für S2, S3, S4, S5, S7, S8, S12 und S20 ermittelt. Entsprechende (Maus-)Antiseren führten mit 30S Subpartikeln, die ausschließlich unfixiert waren, zu Präzipitationslinien.

Untersuchungen mit 50S Untereinheiten ergaben, daß die Antiseren gegen 28 der 34 50S-Proteine mit ihren entsprechenden Proteinen in situ reagierten, und zwar unabhängig davon, ob die Subpartikel aldehydfixiert oder unbehandelt waren (Hasenbank und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse; zitiert in Stöffler, 1974). Anti-L13, -L15, -L24, -L26, -L28 und -L29 präzipitierten fixierte 50S Untereinheiten schwächer als unbehandelte Partikel.

Die Doppeldiffusionsmethode weist sich gegenüber den Sedimentationstechniken durch zwei Eigenschaften aus: 1. Die Präzipitationsteste werden unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt und ermöglichen somit, auch die Reaktionen von Antikörpern mit geringer Avidität nachzuweisen. 2. Da zur Ausbildung von Präzipitaten theoretisch mindestens zwei reaktive antigene Determinanten vorliegen müssen, kann gefolgert werden, daß ein Protein, das mittels Diffusionstest als zugänglich nachzuweisen ist, auch mit wenigstens zwei Determinanten an der Ribosomenoberfläche liegt. Allerdings reicht - anders als bei den Sedimentationsversuchen - eine einzige Determinante eines erreichbaren Proteins zum Reaktionsnachweis nicht aus.

Immunologische "Sandwich"-Versuche: Die immunologische "Sandwich"-Methode ist als zweite Präzipitationstechnik angewendet worden (Stöffler et al., 1973). Radioaktiv markierte Untereinheiten werden mit Antikörpern, die in Kaninchen gegen isolierte 30S-Proteine gewonnen sind, vorinkubiert und die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe dann mit einem gegen Kaninchen-Antikörper spezifischen Schaf-Antiserum ausgefällt. Dieses Helferserum bewirkt die Präzipitation löslicher Antigen-Antikörper-Aggregate. Die Radioaktivität im Präzipitat ist ein Maß für den Anteil aller gebildeten Komplexe.

Im Gegensatz zu den Diffusionstesten erlauben die "Sandwich"-Versuche, auch bindende, aber nichtpräzipitierende Immunglobuline nachzuweisen und somit ein Protein mit nur einer einzigen zugänglichen Determinante als erreichbar zu bestimmen. Weiterhin lassen sich die Ergebnisse dieser Versuche quantitativ auswerten.

"Sandwich"-Experimente wurden bislang nur mit isolierten 30S Untereinheiten durchgeführt (Stöffler et al., 1973). Sie ergaben, daß alle 21 Proteine in der 30S Subpartikel zugänglich sind - also auch S17, das durch keine der bisher besprochenen Methoden als erreichbar ermittelt wurde. Fast alle einzelproteinspezifischen Antikörper präzipitierten je 25-80% der eingesetzten Untereinheiten. Nur Anti-S3, -S8 und -S15 führten zu Präzipitationen, die jeweils zwischen 18 und 25% lagen.

### c. Inhibition der ribosomalen Funktion durch Antikörper

Die zuvor beschriebenen quantitativen Untersuchungen zeigten, daß nahezu alle Antikörperpräparationen nur einen Teil der jeweils eingesetzten Ribosomen in Ribosomen-Antikörper-Komplexen vernetzten. Wie schon besprochen, ist nur eine Fraktion einer Ribosomenpopulation funktionell aktiv

(Gilbert, 1963; s. Abschnitt I.3.4.b). Da deshalb nicht von vornherein ausgeschlossen werden konnte, daß diese partiellen Reaktionsergebnisse durch die alleinige Erfassung inaktiver Ribosomen bedingt waren, wurde der Einfluß von IgG-Antikörpern oder ihren monovalenten Fragmenten (Fabs) auf die ribosomale Funktion untersucht (für eine Zusammenfassung s. Stöffler, 1974; eine kurze Übersicht über den ribosomalen Funktionszyklus ist in Abschnitt 1. der Einleitung gegeben). Bei diesen Studien ging man davon aus, daß durch die Antikörperbindung an das Ribosom die Anlagerung von z.B. mRNS, tRNS oder Proteinfaktoren blockiert und somit die Funktion des Ribosoms völlig oder teilweise gehemmt wird.

In einigen Versuchen wurden die Antikörpereffekte auf Teilfunktionen wie die Bindung der Faktoren EF-Tu, EF-G, RF1 und RF2 an das Ribosom und die davon abhängigen Reaktionen bei der Elongation bzw. Termination ermittelt (Kischa et al., 1971; Highland et al., 1973, 1974a, b; Maschler, 1973; Lelong et al., 1974; Tate et al., 1975). Jeweils nur wenige Immunglobulinpräparationen inhibierten eine der Teilfunktionen; dies ließ auf die Beteiligung auch nur weniger Proteine an einem der Funktionsschritte schließen.

In anderen Experimenten wurden die Auswirkungen auf die Poly-U-abhängige Poly-Phe-Synthese bestimmt, bei der außer spezifischer Initiation und Termination alle ribosomalen Funktionsschritte durchlaufen werden (Maschler, 1973; Stöffler et al., 1973; Lelong et al., 1974; Lütgehaus und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse; s. auch Stöffler, 1974). Es zeigte sich, daß die Antikörper gegen 54 ribosomale Proteine hemmend wirkten (Anti-S17 wurde nicht getestet). Jedes dieser Proteine übt folglich 1. Einfluß auf wenigstens einen Schritt der Poly-Phe-Synthese aus und ist 2. an der Oberfläche funktionell aktiver Ribosomen für Antikörper erreichbar. Die mit den übrigen immunologischen Methoden ermittelten Daten geben somit die Proteinzugänglichkeit in funktionsfähigen Ribosomen wieder.

#### I.3.5.2. Physikochemische Versuche

Zu den ersten Studien über die Proteinzugänglichkeit im Ribosom gehören Untersuchungen, bei denen der Tritium-Wasserstoff-Austausch zwischen  $^3\text{H}$ -markierten Ribosomen und dem Lösungsmittel gemessen wurde (Cotter und Gratzner, 1971). Es zeigte sich, daß die Wechselrate des austauschbaren Tritiums im Proteinanteil unerwartet niedrig lag. Die Autoren schlossen daraus, daß die Proteine nur in geringem Maße an der Ribosomenoberfläche liegen. Dieses Ergebnis steht nicht in Widerspruch zu den Resultaten der vorliegenden



Arbeit, weil bekanntlich zur Erkennung einer antigenen Determinante an der Ribosomenoberfläche durch Antikörper nur ein kleiner zugänglicher Proteinbereich von minimal 4-6 Aminosäuren nötig ist (s. Abschnitt I.3.1.1.).

Um im Gegensatz zu den Tritium-Austauschexperimenten Aussagen über die Erreichbarkeit individueller Proteine im Ribosom machen zu können, wurden neben den immunologischen Untersuchungen von mehreren Arbeitsgruppen chemische Modifikationen der Ribosomen sowie Trypsinverdauungsversuche durchgeführt.

#### I.3.5.3. Chemische Modifikation

Intakte ribosomale Untereinheiten wurden mit Reagenzien behandelt, die Aminosäureseitenketten spezifisch modifizieren. Modifizierbare Proteine klassifizierte man als Komponenten der Ribosomenoberfläche. Zwei in ihrem Aufbau unterschiedliche Methoden wurden angewendet: Die ribosomalen Proteine in situ wurden entweder durch direkte Inkubation mit dem chemisch reaktiven Reagens - d.h. nichtenzymatisch - oder mit Hilfe enzymatischer Katalyse modifiziert. Die Versuchsergebnisse mit Literaturangaben befinden sich in den Tabellen 22 und 23.

Die nichtenzymatische Modifikation wurde am häufigsten durchgeführt. Die Autoren der ersten Untersuchungen interpretierten ihre Befunde noch dahingehend, daß sehr reaktive Proteine in stärkerem Maße an der Ribosomenoberfläche orientiert seien als schwach reaktive und daß unmodifizierbare Proteine im Ribosomeninneren lägen (Craven und Gupta, 1970). Die Studien mit einer Vielzahl von Reagenzien, die gegen jeweils verschiedene Aminosäureseitenketten spezifisch sind, ergaben jedoch zusammenfassend folgendes: Jedes 30S- und 50S-Protein ist in seiner entsprechenden Untereinheit erreichbar. Allerdings eignet sich nicht jedes Reagens zur Modifikation aller Proteine. Lediglich bei der Behandlung mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und Essigsäureanhydrid (HAc-Anhydrid) sowie bei der reduktiven Alkylierung (Red. Alkyl.) und Jodierung (Jod.) wird beinahe jedes 30S-Protein modifiziert (Tabelle 22). Ebenso reagieren fast alle 50S-Proteine nur mit Essigsäureanhydrid und 2-Methoxy-5-Nitrotronon (MNT) und bei der reduktiven Alkylierung (Tabelle 23).

Die auffälligen Reaktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungen lassen sich wie folgt erklären: Wie bereits für die Antikörperbindung ausgeführt, ist es nicht zwingend, daß ein an der Oberfläche vorkommendes Protein auch eine reaktive Gruppe zugänglich hat (vergleiche Abb. 11). So ist beispielsweise bekannt, daß mehrere Proteine gar keine Aminosäurereste



enthalten, die für das gewählte Reagens spezifisch sind (z.B. Cysteine für SH-gruppenspezifische Reagenzien und Tyrosine zur Jodierung) (Craven et al., 1969; Kaltschmidt et al., 1970; Mora et al., 1971). Einzelne an der Oberfläche liegende Aminosäuren wie z.B. Lysine könnten aber auch durch Wechselwirkungen mit der rRNS blockiert sein (Daya-Grosjean et al., 1974). Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die Ribosomen nicht einheitlich präpariert wurden und somit unterschiedlich reaktiv sein könnten.

Die nichtenzymatischen Modifikationsmethoden weisen eine entscheidende Limitation auf. Wegen der Kleinheit der Reagenzien (MG <400 Dalton) im Vergleich zu den Untereinheiten (30S: MG  $0,9 \times 10^6$  Dalton; 50S: MG  $1,55 \times 10^6$  Dalton) kann nicht ausgeschlossen werden, daß sie die Subpartikel penetrieren und mit innengelegenen Aminosäureresten reagieren. Trotz dieser Einschränkung für die Zugänglichkeitsstudien würden sich diese kleinen Reagenzien jedoch besonders für solche Experimente eignen, bei denen unter definierten Bedingungen - etwa nach Zamir et al. (1974) - distinkte Konformationsänderungen im Ribosom nachgewiesen werden sollen (s. z.B. Ginzburg und Zamir, 1975).

Um eine mögliche Reaktion im Ribosomeninneren zu verhindern, wurde eine enzymatische Modifikationstechnik, die durch Lactoperoxidase katalysierte Jodierung, angewendet (Miller und Sypherd, 1973a, b; Michalski und Sells, 1974, 1975; Litman und Cantor, 1974). Aufgrund der Größe des Enzyms (MG 78000 Dalton) sollte es ebenso wie die IgG-Antikörper ausschließlich auf der Ribosomenoberfläche reagieren. Es war deshalb nicht verwunderlich, daß die Proteine im Ribosom bei enzymatischer und nichtenzymatischer Jodierung unterschiedlich reaktiv waren. Für die 30S Untereinheit wurde gezeigt, daß zwar alle Proteine außer S1 durch beide Methoden jodiert werden, daß jedoch mehrere Proteine nach enzymatischer Behandlung in geringerem Maße modifiziert sind als nach nichtenzymatischer (Miller und Sypherd, 1973b) (Tabelle 22).

Die ausschließlich enzymatisch durchgeführte Jodierung bei der Untersuchung von 50S Untereinheiten ergab, daß 29 Proteine modifizierbar sind (Tabelle 23) (Michalski und Sells, 1974, 1975; Litman und Cantor, 1974). Neben L7/L12, die kein für die Jodierung erforderliches Tyrosin aufweisen, ist nur noch L20 nach der Behandlung der Ribosomen unverändert gewesen. Für L31 und L34 liegen keine Informationen vor.

## Legende zu Tabelle 22:

- a Moore, P., 1971
- b Ginzburg et al., 1973
- c Gavrilova und Spirin, 1974
- d Bakardjieva und Crichton, 1974
- e Craven und Gupta, 1970
- f Huang und Cantor, 1972
- g Visentin et al., 1973
- h Moore, G. und Crichton, 1974
- i Noller et al., 1971
- j Benkov und Delihias, 1974
- k Miller und Sypherd, 1973b
- l Michalski und Sells, 1974, 1975
- m Kahan und Kaltschmidt, 1972

NEM = N-Äthylmaleinimid

JAA = Jodacetamid

JA = Jodacetat

PCMB = p-Chloromercuribenzoat

FITC = Fluorescein Isothiocyanat

Glutarald. = Glutaraldehyd

HAC-Anhydrid = Essigsäureanhydrid

Ex.-Index = Exposure Index (1,0<sup>a</sup> völlig zugänglich,  
0,0<sup>a</sup> völlig unzugänglich)

MNT = 2-Methoxy-5-Nitroproton

Red. Alkyl. = Reduktive Alkylierung

Kethoxal =  $\beta$ -Ethoxy- $\alpha$ -Ketobutyraldehyd

Jod. = Jodierung

$\alpha$  kein Cystein im Protein nachgewiesen (Craven et al., 1969)

$\beta$  mit undissoziierten 70S Ribosomen durchgeführt

§ mit funktionell inaktiven 30S durchgeführt

= S9 und S11 nicht zu trennen

" für S1 variable Ergebnisse

& Komplexe mit (S3, S12, S13, S14), (S4, S5, S8) und (S12, S13, S16, S17)  
nicht aufgelöst

Die Reaktivität von NEM mit Protein S9 (Ref b) - einem Protein, das kein Cystein enthält (Craven et al., 1969) - läßt sich damit erklären, daß NEM unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht ausschließlich für Cystein spezifisch ist.

+ das Protein ist reaktiv, d. h. zugänglich

- negatives Ergebnis

... keine Information

(+++ , ++ , + ,  $\pm$  , ( $\pm$ ) graduelle Abstufung positiver Zugänglichkeitsergebnisse,  
wie von den Autoren angegeben)

Tabelle 22. Zugänglichkeit 30S-ribosomaler Proteine

| Protein          | Immuno-<br>logie | Nichtenzymatische   |                  |                  |                          |                  |                 |                   |                   |                              |                |
|------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------------------|----------------|
|                  |                  | Reagens             |                  |                  |                          |                  |                 |                   |                   |                              |                |
|                  |                  | Lys. und/oder freie |                  |                  |                          |                  |                 |                   |                   |                              |                |
|                  |                  | Cys.                |                  |                  |                          |                  |                 |                   |                   |                              |                |
|                  |                  | NEM <sup>a</sup>    | NEM <sup>b</sup> | NEM <sup>c</sup> | NEM+ <sup>d</sup><br>JAA | JAA <sup>c</sup> | JA <sup>e</sup> | PCMB <sup>c</sup> | FITC <sup>f</sup> | Glutar- <sup>m</sup><br>ald. | HA<br>hy<br>Ex |
| S1               | +                | +++                 | §                | +++              | +                        | ++               | +               | +++               | +++               | +++                          |                |
| S2               | +                | -                   | +                | -                | +                        | -                | -               | -                 | +++               | ++                           |                |
| S3 <sup>α</sup>  | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | -                 | +++               | ++                           |                |
| S4               | +                | +                   | +                | ++               | -                        | -                | -               | +                 | +++               | -                            |                |
| S5 <sup>α</sup>  | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | -                 | +++               | +                            |                |
| S6 <sup>α</sup>  | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | -                 | +                 | ++                           |                |
| S7 <sup>α</sup>  | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | -                 | +++               | +                            |                |
| S8               | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | -                 | (±)               | +                            |                |
| S9 <sup>α</sup>  | +                | -                   | +                | -                | -                        | -                | -               | -                 | +++               | ?± <sup>m</sup>              |                |
| S10 <sup>α</sup> | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | -                 | -                 | +++                          |                |
| S11              | +                | +++                 | -                | ++               | -                        | ±                | +               | +                 | ...               | ?± <sup>m</sup>              |                |
| S12              | +                | -                   | +                | +                | +                        | -                | -               | +++               | +++               | -                            |                |
| S13              | +                | -                   | §                | ++               | +                        | +++              | -               | +                 | +++               | ++                           |                |
| S14              | +                | -                   | §                | -                | -                        | -                | -               | -                 | +++               | +                            |                |
| S15              | +                | -                   | -                | +                | -                        | -                | -               | -                 | ++                | -                            |                |
| S16 <sup>α</sup> | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | - )               | -                 | -                            |                |
| S17              | +                | -                   | +                | ++               | -                        | -                | -               | +                 | - )               | -                            |                |
| S18              | +                | +++                 | §                | +++              | +                        | +++              | +               | +++               | +++               | ++                           |                |
| S19              | +                | -                   | +                | -                | -                        | -                | -               | -                 | +++               | ++                           |                |
| S20 <sup>α</sup> | +                | -                   | -                | -                | -                        | -                | -               | -                 | ++                | -                            |                |
| S21              | +                | +                   | §                | +++              | +                        | +++              | +               | +++               | +++               | ++                           |                |

itu für modifizierende Reagenzien

| ifikation                |                  |                   |                         |                      | Enzym. Mod.       |                   |                   |         |
|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|
| fisch für:               |                  |                   |                         |                      |                   |                   |                   |         |
| -NH <sub>2</sub> -Gruppe |                  |                   | His.                    | Arg.                 | Tyr.              |                   |                   |         |
| g                        | MNT <sup>e</sup> | Red. <sup>h</sup> | Rose <sup>i,&amp;</sup> | Keth- <sup>j,8</sup> | Jod. <sup>k</sup> | Jod. <sup>k</sup> | Jod. <sup>l</sup> | Protein |
| index                    |                  | Alkyl.            | Bengal                  | oxal                 |                   |                   |                   |         |
|                          | +                | +++"              | +                       | -                    | ...               | ...               | ...               | S1      |
|                          | -                | ++                | +                       | +++                  | +++               | +                 | +++               | S2      |
|                          | +                | ++                | ?+                      | +++                  | ++                | +                 | +++               | S3      |
| 6                        | -                | +                 | ?+                      | +++                  | +++               | +                 | +                 | S4      |
| 2                        | -                | +                 | ?+                      | +++                  | ++                | +                 | ++                | S5      |
|                          | -                | +++               | -                       | ++                   | ++                | ++                | +                 | S6      |
| 0                        | -                | +                 | +                       | +++                  | +                 | +                 | +++               | S7      |
| 88                       | -                | +                 | ?+                      | -                    | +                 | +                 | +                 | S8      |
| 8                        | -                | +                 | -                       | ++                   | +++               | +++               | +++               | S9      |
|                          | -                | +++               | +                       | -                    | +                 | +                 | +++               | S10     |
| 8                        | +                | ++                | -                       | +                    | ++                | +                 | +++               | S11     |
| 3                        | -                | +                 | ?+                      | -                    | ++                | ++                | +++               | S12     |
| 4                        | ...              | +                 | ?+                      | ++                   | ++                | +                 | ++                | S13     |
| 4                        | +                | +                 | ?+                      | -                    | ++                | +                 | +++               | S14     |
| 6                        | -                | +                 | -                       | -                    | +                 | +                 | +                 | S15     |
| 5                        | -                | +                 | ?+                      | -                    | +                 | +                 | +                 | S16     |
| 4                        | -                | +                 | ?+                      | -                    | +                 | +                 | ++                | S17     |
| 0                        | +                | +                 | -                       | ++                   | +++               | ++                | ++                | S18     |
| 6                        | -                | ++                | +                       | +                    | ++                | +                 | +++               | S19     |
| 0                        | -                | +                 | +                       | -                    | ++                | +                 | +                 | S20     |
|                          | +                | +                 | +                       | +                    | +                 | ++                | +++               | S21     |

## Legende zu Tabelle 23:

- a Sonenberg et al., 1973
- b Moore, P., 1971 (aus <sup>k</sup> übernommen)
- c Bakardjieva und Crichton, 1974
- d Kahan und Kaltschmidt, 1972
- e Hsiung und Cantor, 1973
- f Ballesta et al., 1974
- g Visentin et al., 1973
- h Moore, G. und Crichton, 1974
- i Benkov und Delihass, 1974
- j Michalski und Sells, 1974, 1975
- k Litman und Cantor, 1974

BAPME = N-Bromacetylphenylalanyl Methylester

Für alle übrigen Abkürzungen siehe Legende zu Tabelle 22.

- <sup>a</sup> kein Cystein im Protein nachgewiesen (Mora et al., 1971)
- <sup>β</sup> mit undissoziierten 70S Ribosomen durchgeführt
- <sup>\$</sup> L7 und L12 nicht aufgelöst
- <sup>\$\$</sup> L26 und L28 nicht aufgelöst
- <sup>&</sup> kein Tyrosin in L7 und L12 nachgewiesen

Die Reaktivität von BAPME mit den Proteinen L7/L12, L22, L28, L30 und L33 (Ref. a), von NEM mit L7/L12 (Ref. a) und L20 (Ref. b) und von NEM + JAA mit L20 (Ref. c) - jedes dieser Proteine enthält kein Cystein (Mora et al., 1971) - läßt sich damit erklären, daß die Reagenzien unter den jeweils gewählten Bedingungen nicht ausschließlich für Cystein spezifisch sind.

- + das Protein ist reaktiv, d. h. zugänglich
- negatives Ergebnis
- ... keine Information
- (+++ , ++ , + , ± graduelle Abstufung positiver Zugänglichkeitsergebnisse, wie von den Autoren angegeben)

#### I.3.5.4. Tryptische Verdauung

Intakte ribosomale Untereinheiten wurden mit dem proteolytischen Enzym Trypsin behandelt (Craven und Gupta, 1970; Chang und Flaks, 1970, 1971; Crichton und Wittmann, 1971; Spitnik-Elson und Breiman, 1971). Die Versuche, die sowohl mit löslichem als auch mit trägergebundenem Trypsin durchgeführt wurden, zeigten, daß je nach gewählter Versuchsbedingung einige oder alle Proteine der 30S und 50S Untereinheiten zu verdauen waren (Tabelle 24). Die Reihenfolge, in der die Einzelproteine in situ hydrolysiert wurden, nahmen die Autoren als Maß für den Grad der Proteinzugänglichkeit. Ein Protein, das kurz nach Beginn der Hydrolyse verdaut wurde, war demnach als ein an der Ribosomenoberfläche stark zugängliches Protein zu klassifizieren, während ein später hydrolysiertes Protein als ein im Ribosomeninneren geschütztes Protein angesehen wurde. Dem ist entgegenzusetzen, daß die Trypsinsensitivität der Proteine nicht nur eine Funktion ihrer Lage an der Ribosomenoberfläche ist:

Wie bei allen Zugänglichkeitsstudien ist die Voraussetzung für die Reaktivität der Proteine neben ihrer Orientierung an der Oberfläche die Erreichbarkeit von mindestens einer reaktiven Gruppe - in diesem Fall von einer spaltbaren Aminosäuresequenz. Hultin und Östner (1968) zeigten, daß die Hydrolysierbarkeit von Proteinen durch Trypsin von der Proteinform, von Interaktionen mit benachbarten Proteinen und Protein-RNS-Wechselwirkungen abhängig ist. Dies wird durch Befunde über die Verdaubarkeit eines 50S-ribosomalen Proteins unterstützt (Crichton und Wittmann, 1973). L24, das als freies Protein trypsinsensitiv ist, erweist sich in einem L24-23S RNS-Komplex als völlig geschützt.

Schließlich besteht die Möglichkeit, daß innengelegene Proteine verdaut werden, obwohl aus den zuvor erwähnten Gründen eine Diffusion von Trypsin (MG 15100 Dalton) in das Ribosom unwahrscheinlich ist. Das Enzym könnte nämlich nach der Hydrolyse exponierter Proteine innengelegene Proteine sukzessiv an- oder verdauen.

#### I.3.6. Zusammenfassung

Jedes ribosomale Protein ist an der Oberfläche seiner Untereinheit zugänglich. Aufgrund ihrer uneingeschränkten Aussage über Reaktionen an der Ribosomenoberfläche geben die immunologischen Studien der vorliegenden Arbeit sowie die anderer Autoren und die enzymatischen Jodierungsversuche die verlässlichsten Daten über Proteinzugänglichkeiten. Die Resultate



nichtenzymatischer Modifikationen und tryptischer Verdauung sind eingeschränkt, decken sich jedoch im wesentlichen mit den Ergebnissen der zuvor erwähnten Methoden.

Die Resultate über Proteine, die in isolierten Untereinheiten eine andere Erreichbarkeit als in undissoziierten 70S Ribosomen aufweisen, sind in diesem Abschnitt unberücksichtigt geblieben. Da erst nach der Präsentation der immunelektronenmikroskopischen Befunde in Ergebnisteil III. für mehrere Proteine eine Entscheidung darüber getroffen werden kann, ob ihre unterschiedliche Erreichbarkeit auf eine Anordnung im Untereinheiten-Grenzbereich oder aber auf verschiedene Konformationen der Untereinheiten zurückzuführen ist, wird die entsprechende Diskussion erst in Abschnitt 1.1. der Schlußdiskussion vorgenommen.

Tabelle 24. Zugänglichkeit ribosomaler Proteine in situ für Trypsin

## a. 30S-Proteine

| Protein | Tr. geb. <sup>a</sup><br>Trypsin | Tr. geb.+ <sup>b</sup><br>lösl.<br>Trypsin | Lösl. <sup>c</sup><br>Trypsin | Lösl. <sup>d</sup><br>Trypsin |
|---------|----------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| S1      | +                                | ...                                        | +                             | +                             |
| S2      | +                                | ++                                         | ...                           | +                             |
| S3      | +                                | ++                                         | +++                           | +                             |
| S4      | -                                | +                                          | -                             | +                             |
| S5      | +                                | +                                          | +                             | +                             |
| S6      | +                                | +++                                        | ...                           | +                             |
| S7      | -                                | +                                          | ++                            | +                             |
| S8      | -                                | +                                          | -                             | +                             |
| S9      | -                                | +                                          | +                             | +                             |
| S10     | +                                | ++                                         | ...                           | +                             |
| S11     | ...                              | ++                                         | +++                           | +                             |
| S12     | -                                | +                                          | -                             | +                             |
| S13     | ...                              | ++                                         | -                             | +                             |
| S14     | -                                | +                                          | +                             | +                             |
| S15     | -                                | +                                          | ...                           | ...                           |
| S16     | -                                | +                                          | -                             | } +                           |
| S17     | -                                | +                                          | -                             |                               |
| S18     | -                                | +                                          | -                             |                               |
| S19     | +                                | +++                                        | ++                            | +                             |
| S20     | -                                | +                                          | -                             | +                             |
| S21     | +                                | ++                                         | +++                           | +                             |

<sup>a</sup> Craven und Gupta, 1970<sup>b</sup> Crichton und Wittmann, 1971<sup>c</sup> Chang und Flaks, 1970<sup>d</sup> Spitnik-Elson und Breiman, 1971<sup>e</sup> Chang und Flaks, 1971 (aus Hsiung und Cantor, 1973, übernommen)

Tr. geb. Trypsin = an Träger gebundenes Trypsin

lösl. Trypsin = lösliches Trypsin

+ das Protein wird verdaut, d. h. ist zugänglich

- negatives Ergebnis

... keine Information

(+++ , ++ , + , + graduelle Abstufung positiver Zugänglichkeitsergebnisse, wie von den Autoren angegeben)

## Fortsetzung: Tabelle 24

## b. SOS-Proteine

| Protein | Tr. geb.+ <sup>b</sup><br>lösl. Trypsin | Lösl. d<br>Trypsin | Lösl. e<br>Trypsin |
|---------|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|
| L1      | +++                                     | +                  | ++                 |
| L2      | +++                                     | +                  | ++                 |
| L3      | +                                       | +                  | -                  |
| L4      | +++                                     | +                  | +++                |
| L5      | +++                                     | +                  | ++                 |
| L6      | +++                                     | +                  | -                  |
| L7      | +++                                     | +                  | ...                |
| L8      | +++                                     | +                  | +++                |
| L9      | +++                                     | +                  | +++                |
| L10     | +++                                     | +                  | -                  |
| L11     | +++                                     | +                  | -                  |
| L12     | +++                                     | +                  | ...                |
| L13     | ++                                      | +                  | ...                |
| L14     | ++                                      | +                  | ...                |
| L15     | ++                                      | +                  | ++                 |
| L16     | +++                                     | +                  | ++                 |
| L17     | ++                                      | +                  | ++                 |
| L18     | +                                       | +                  | ++                 |
| L19     | +                                       | +                  | +++                |
| L20     | ++                                      | +                  | +++                |
| L21     | ++                                      | +                  | ...                |
| L22     | +                                       | +                  | ...                |
| L23     | ++                                      | +                  | ...                |
| L24     | -                                       | +                  | -                  |
| L25     | ++                                      | +                  | ...                |
| L26     | ++                                      | +                  | ...                |
| L27     | +                                       | +                  | +++                |
| L28     | +                                       | +                  | ...                |
| L29     | ++                                      | +                  | ...                |
| L30     | +                                       | +                  | ...                |
| L31     | ...                                     | +                  | ...                |
| L32     | +                                       | +                  | ...                |
| L33     | ++                                      | +                  | ...                |
| L34     | ...                                     | ...                | ...                |

Legende s. Tabelle 24.a.

## II. Vernetzung ribosomaler Proteine *in situ* durch bifunktionelle Reagenzien - Immunologische Identifizierung von benachbarten Proteinen

### II.1. Einleitung

Kleine bifunktionelle Reagenzien eignen sich zur strukturellen Charakterisierung von Molekülkomplexen. Derartige proteinspezifische Reagenzien wurden zuerst zur Untersuchung oligomerer Enzymkomplexe verwendet (Davies und Stark, 1970) und in der Folge zur Aufklärung der Nachbarschaftsbeziehungen ribosomaler Proteine *in situ* eingesetzt. Bei letzteren Untersuchungen konnte davon ausgegangen werden, daß zwei Proteine, die nach der Vernetzung intakter Ribosomen kovalent verbunden in einem Komplex nachzuweisen sind, im Ribosom benachbart vorliegen. Man nahm an, daß durch die Analyse einer ausreichenden Anzahl solcher Proteinpaare die Organisation der Proteine im Ribosom aufzuklären sei. Es zeigte sich aber schon bei den ersten Studien, daß diese Reagenzien bei der Inkubation mit Ribosomen zwar - je nach gewähltem Reagens - wenige oder viele Komplexe bildeten, daß jedoch in den meisten Fällen die Identifizierung der verknüpften Proteine äußerst schwierig war (zur Übersicht s. Kurland, 1974a; Traut et al., 1974).

Die ersten Untersuchungen wurden mit dem für SH-Gruppen spezifischen N,N'-p-Phenyldimaleinimid (PDM) an 30S Untereinheiten durchgeführt. Da Cysteine in 30S-ribosomalen Proteinen relativ selten vorkommen (Craven et al, 1969), war kein starker Vernetzungsgrad zu erwarten. Das spiegelte sich schließlich auch in der geringen Ausbeute an Proteinkomplexen wider; nur ein Aggregat mit den Proteinen S18 und S21 wurde nachgewiesen (Chang und Flaks, 1972; Kurland et al., 1972b).

Chang und Flaks hatten nur indirekte Hinweise für eine Vernetzung von S18 und S21 durch PDM. Gelelektrophoretische Proteintrennungsmuster von PDM-behandelten 30S Untereinheiten ergaben Verringerungen der Separationsbanden von S18 und S21 und zusätzlich zu den übrigen Proteinen eine neue Komponente, deren Molekulargewicht etwa der Summe der Molekulargewichte von S18 und S21 entsprach.

Die eindeutige Identifizierung eines Vernetzungsproduktes aus diesen beiden Proteinen gelang Lutter (s. Kurland et al., 1972b). 30S Untereinheiten, die mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Protein S18,  $^3\text{H}$ -markiertem S21 und den übrigen 19 unmarkierten Proteinen rekonstituiert worden waren, wurden mit PDM inkubiert. Anschließend elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteingemisches ergab, daß im Vergleich zum Trennungsmuster entsprechender unbehandelter

30S Untereinheiten eine neue Komponente mit  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -Aktivität, also der Komplex S18-S21, auftrat. Obwohl diese Methode eindeutige Charakterisierungen von Proteinkomplexen zuließ, hatte sie den Nachteil, daß Doppelmarkierungsversuche zu aufwendig waren, um die Nachbarschaftsbeziehungen der ribosomalen Proteine in situ systematisch aufzuklären.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden zur Charakterisierung von Komplexen neben gelelektrophoretischen Untersuchungen Bestimmungen mit Antisera gegen die 21 Einzelproteine der 30S Untereinheit durchgeführt. Anhand des Komplexes S18-S21 konnte gezeigt werden, daß sich die immunologische Methode gut zur Identifizierung vernetzter Proteine eignet.

Um weitere in der 30S Untereinheit benachbarte Proteine zu ermitteln, wurde das bifunktionelle Reagens Dimethyladipimidat Dihydrochlorid (DMA) verwendet, das wegen seiner Spezifität für die  $\text{NH}_2$ -Gruppe von Lysin - diese Aminosäure kommt in ribosomalen Proteinen relativ häufig vor (Craven et al., 1969; Kaltschmidt et al., 1970) - eine entsprechend große Ausbeute an Proteinkomplexen erwarten ließ. Eins der zahlreich auftretenden Aggregate, das Proteinpaaar S5-S8, ist sowohl gelelektrophoretisch als auch immunologisch charakterisiert worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind bereits veröffentlicht (Lutter, Zeichhardt, Kurland und Stöffler, 1972).

## II.2. Ergebnisse

### II.2.1. Nachweis der Nachbarschaft von S18 und S21 in der 30S Untereinheit

#### II.2.1.1. Gelelektrophoretische und säulenchromatographische Darstellung des Komplexes PDM 1

30S Untereinheiten wurden mit dem bifunktionellen  $\text{N,N}'$ -p-Phenyldimaleinimid (PDM) behandelt, das mit zwei maximal  $12\text{\AA}$  voneinander entfernten Cysteinen reagieren kann (s. "Materialien und Methoden"). Danach wurden die Proteine aus den Untereinheiten extrahiert und auf "Soft"-Polyacrylamidgelen bei pH 4,5 aufgetrennt (Abb. 13C). Zur Kontrolle wurden die Proteine aus Subpartikeln, die entweder unbehandelt oder aber mit N-Phenylmaleinimid (PM) - einem monofunktionellen Analogon von PDM - inkubiert worden waren, in gleicher Weise separiert (Abb. 13A u. B). Während die Proteintrennungsmuster der unbehandelten und der mit PM inkubierten Subpartikel identisch waren, wies das Muster PDM-behandelter Untereinheiten eine Intensitätsabnahme der jeweiligen Bande mit Protein S18 bzw. S21 auf. Ein neues Produkt, das einem

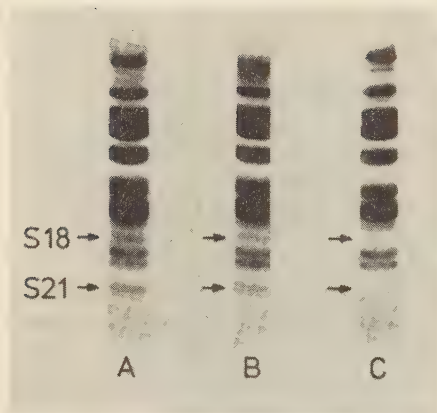


Abb. 13

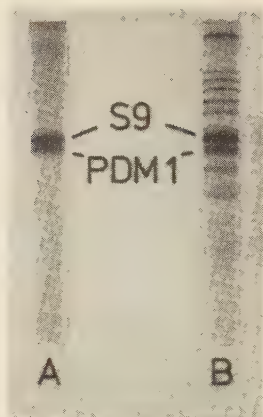


Abb. 14

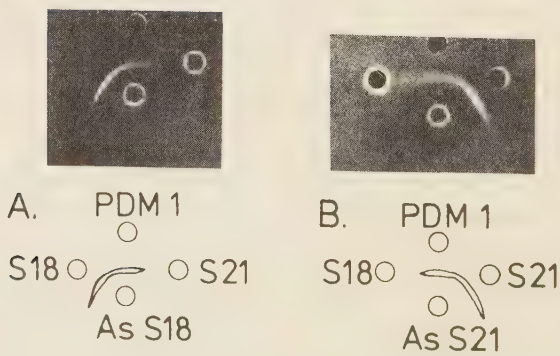


Abb. 15



Komplex S18-S21 hätte entsprechen können, ließ sich jedoch in den Gelen nicht nachweisen.

Zur Identifizierung des gebildeten Komplexes war folglich seine Isolierung notwendig. Dazu wurden die Proteine PDM-behandelter 30S Untereinheiten über Cellulosephosphat-Ionenaustauschersäulen aufgetrennt. Da aber auch hierbei, verglichen mit dem Proteinelutionsprofil unbehandelter Untereinheiten, im Profil PDM-modifizierter Subpartikel nicht einmal annähernd ein neuer Gipfel mit dem Komplex zu erkennen war, wurde auf "Soft"-Polyacrylamidgelen jede zweite Elutionsfraktion auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht. Mit Hilfe dieser Methode konnte ein neues Produkt - PDM 1-Komplex - nachgewiesen werden, das auf der Austauschersäule zwischen jeweils unvernetztem S18 und S21 aufgetrennt wurde, und zwar näher an S18 zusammen mit S9 und S14 (s. auch Abb. 18A). Die Fraktion mit PDM 1 wurde über Sephadex G-100-Säulen nachgereinigt. Dabei ließ sich der Komplex zwar gut von S14, nicht aber von S9 trennen, wie die Analyse mit "Soft"-Gelelektrophorese ergab (Abb. 14).

Trotz dieser aufwendigen Isolierungsschritte konnte PDM 1 weder vollkommen von Kontaminationen befreit noch identifiziert werden. Da einerseits wegen der Verunreinigung und andererseits aufgrund sehr geringer Ausbeute eine chemische Charakterisierung des Komplexes nicht möglich war, wurde eine immunologische Methode angewendet.

Legenden zu den Abbildungen 13, 14 und 15:

Abb. 13. "Soft"-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Proteingemisches PDM-behandelter 30S Untereinheiten

A: Unbehandelte 30S Untereinheiten  
B: PM-behandelte 30S Untereinheiten  
C: PDM-behandelte 30S Untereinheiten

Abb. 14. "Soft"-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von gereinigtem PDM 1-Komplex

A: PDM 1-Komplex (+S9)  
B: PDM 1-Komplex (+S9) zusammen mit 30S-Gesamtproteingemisch

Abb. 15. Immuno-Doppeldiffusionsteste mit PDM 1-Komplex

PDM 1 wurde über Cellulosephosphat- und Sephadex G-100-Säulen isoliert und im Vergleich zu den unvernetzten Einzelproteinen S18 und S21 gegen Antiserum (As)-S18 (A) bzw. Antiserum (As)-S21 (B) getestet. Weitere Erklärungen s. im Text. (aus Lutter, Zeichhardt, Kurland und Stöffler, 1972)

### II.2.1.2. Immunologische Identifizierung des Komplexes PDM 1

Der mittels Sephadex-Chromatographie isolierte Komplex wurde in zweidimensionalen Immuno-Doppeldiffusionsversuchen im "Semimakromaßstab" untersucht (Ouchterlony, 1958; s. auch "Materialien und Methoden"). Dabei reichten ca. 2 µg Protein der Komplexfraktion aus, um gleichzeitig maximal 6 Antisera zu testen.

Von allen Antisera gegen die 21 30S-Proteine bildeten lediglich drei Seren Präzipitationslinien. Anti-S18 und Anti-S21 reagierten stark, während Anti-S9 eine schwache Präzipitation bewirkte. Daraus konnte geschlossen werden, daß die PDM 1-Fraktion ausschließlich die Proteine S9, S18 und S21 enthielt. Da die säulenchromatographischen und gelelektrophoretischen Untersuchungen bereits gezeigt hatten, daß in der Fraktion neben der Verunreinigung von unvernetztem S9 kein unkomplexiertes S18 und S21 vorkam, mußten S18 und S21 die Bestandteile des Komplexes sein.

Die antigenen Eigenschaften des Proteinpaares S18-S21 sind aus Abbildung 15 zu ersehen. PDM 1 reagierte mit Antiserum (As)-S18, wobei die Präzipitationslinie mit der von unvernetztem Protein S18 komplett fusionierte (Abb. 15A). Ebenso bildete Antiserum (As)-S21 mit PDM 1 und mit unbehandeltem Protein S21 miteinander fusionierende Präzipitationslinien (Abb. 15B). Um die Spezifität der verwendeten Seren zu demonstrieren, wurden zur Kontrolle Anti-S18 mit S21 und Anti-S21 mit S18 inkubiert. In beiden Fällen trat keine Präzipitation auf.

Die jeweils komplette Fusion der Präzipitationslinien besagt, daß die Antigenität der Proteine S18 und S21 in unvernetztem und komplexiertem Zustand gleich ist. Wären die Proteine im Komplex dagegen in ihrer Antigenität vermindert worden, würden die Linien der Einzelproteine nur partiell mit der Linie des Komplexes fusionieren und jeweils einen Sporn bilden. Solange die Reaktivität der vernetzten Proteine aber nicht völlig verloren ginge, wäre auch in diesem Fall eine Identifizierung des Komplexes möglich gewesen.

Nachdem für das Proteinpaar S18-S21 gezeigt war, daß die Antigenität der Proteine im Komplex erhalten bleibt, wurden - in der Erwartung, daß dies für vernetzte Proteine generell zutrifft - die einzelproteinspezifischen Antikörper im Folgenden auch zur Charakterisierung des Komplexes S5-S8 eingesetzt.

### II.2.2. Nachweis der Nachbarschaft von S5 und S8 in der 30S Untereinheit

Bei den folgenden Experimenten wurden die 30S Untereinheiten mit dem bifunktionellen Imidoester Dimethyladipimidat Dihydrochlorid (DMA) behandelt, der zwei 9 Å voneinander entfernte  $\text{NH}_2$ -Gruppen von Lysinen vernetzen kann. Als Kontrollreagens wurde das monofunktionelle Analogon Methylhexanoimidat Hydrochlorid (MH) verwendet. Die getesteten Subpartikel waren entweder unmarkiert oder radioaktiv markiert.

#### II.2.2.1. Versuche mit unmarkierten Untereinheiten

##### II.2.2.1.1. Gelelektrophoretische und säulenchromatographische Darstellung eines Komplexes (DMA 1)

Analog zu den Studien mit PDM wurden 30S Untereinheiten mit DMA behandelt (s. "Materialien und Methoden"). Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proteine aus den Untereinheiten extrahiert und auf SDS-Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 8 M Harnstoff aufgetrennt. Im Vergleich zum Proteintrennungsmuster unbehandelter Subpartikel war das Muster DMA-vernetzter Partikel deutlich verändert (Abb. 16C u. D). Zwischen der Trennungsbande mit dem größten Protein (S1, MG 65000 Dalton) und der Bande mit dem zweitgrößten Protein (S2, MG <30000 Dalton) traten mehrere neue Proteinprodukte auf (für die Molekulargewichte der 30S-Proteine s. Craven et al., 1969; Dzionara et al., 1970). Auch im Trennbereich für die kleineren Proteine befanden sich neue Produkte, jedoch war eine Auflösung der einzelnen Banden nicht mehr möglich. Da in Kontrollexperimenten mit dem monofunktionellen MH - einem Imidoester, der nach unabhängigen Untersuchungen mit nahezu zwei Drittel aller Lysine in den 30S-Proteinen reagieren kann (Slobin, 1972) - keinerlei Veränderungen des Proteinmusters zu beobachten waren, konnte gefolgert werden, daß durch DMA viele Proteinkomplexe gebildet wurden.

In Vorversuchen mittels SDS-Gelelektrophorese war gezeigt worden, daß eine Konzentration von 5-8 mM DMA eine optimale Proteinvernetzung bewirkt. Bei niedrigeren Konzentrationen (0,1-2 mM) ließen nur geringe Veränderungen in den Trennungsprofilen auf eine schwache Vernetzung schließen. Höhere Konzentrationen (10-20 mM) führten dagegen zu derart starker Aggregation, daß keine diskreten Banden mehr auftraten (nicht dargestellt).

Wie bei den zuvor beschriebenen Versuchen mit PDM erforderte die Komplexdarstellung auch in diesem Fall säulenchromatographische Isolierungsschritte. Dazu wurde das Gesamtproteingemisch DMA-behandelter Untereinheiten

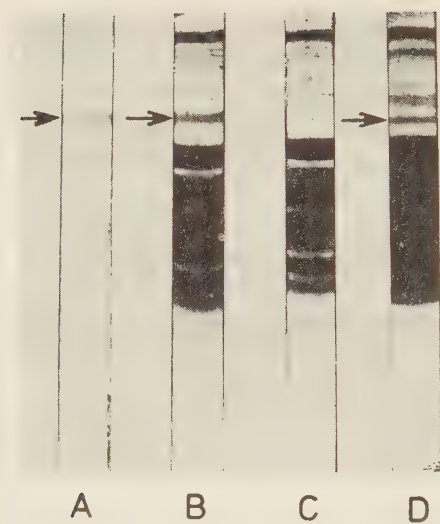
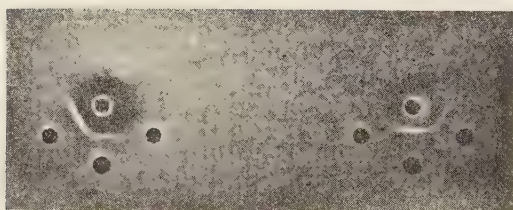


Abb. 16



A. As S5  
S5 ○ S8  
DMA 1

B. As S8  
S5 ○ S8  
DMA 1

Abb. 17

zunächst über Cellulosephosphat-Säulen aufgetrennt. Im Vergleich zu den Proteinen unbehandelter Subpartikel (Abb. 18A) trat einer der zahlreich gebildeten Komplexe - DMA 1-Komplex genannt - zwischen jeweils unvernetztem S5 und S8 auf, und zwar in unmittelbarer Nähe von S5 (Abb. 18B). DMA 1 wurde über Sephadex G-100-Säulen nachgereinigt. Anschließend SDS-Gelelektrophorese zeigte, daß der isolierte Komplex frei von signifikanten Kontaminationen war (Abb. 16A). Elektrophorese auf "Soft"- bzw. "Hard"-Gelen erbrachte gleiche Ergebnisse. Eine Abschätzung des Molekulargewichts des auf SDS-Gelen dargestellten DMA 1-Komplexes ergab ca. 38000 Dalton.

#### II.2.2.1.2. Immunologische Identifizierung des DMA 1-Komplexes

Der über Sephadex-Säulen gereinigte DMA 1-Komplex aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen wurde in Immuno-Doppeldiffusionstesten nach Ouchterlony (1958) auf seine Proteinkomposition untersucht. Von den Antisera gegen die 21 30S-Proteine reagierten nur Anti-S5 und Anti-S8 stark und reproduzierbar mit jedem der vier DMA 1-Präparate. DMA 1 und unbehandeltes Einzelprotein S5 bildeten bei der Inkubation mit Anti-S5 komplett fusionierende Präzipitationslinien (Abb. 17A). Entsprechend wurde eine Fusion der Präzipitationslinien beim Test von Anti-S8 gegen DMA 1 und unbehandeltes Protein S8 beobachtet (Abb. 17B). Es ließen sich keine Reaktionen von Anti-S5 mit S8 sowie von Anti-S8 mit S5 nachweisen. Aus diesen Ergebnissen konnte bereits mit großer Sicherheit geschlossen werden, daß die Proteine S5 und S8 Bestandteile des DMA 1-Komplexes sind. Da beide Antisera mit ihrem homologen Protein und DMA 1 jeweils total fusionierende Präzipitationslinien

---

#### Legenden zu den Abbildungen 16 und 17:

##### Abb. 16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DMA 1-Komplex

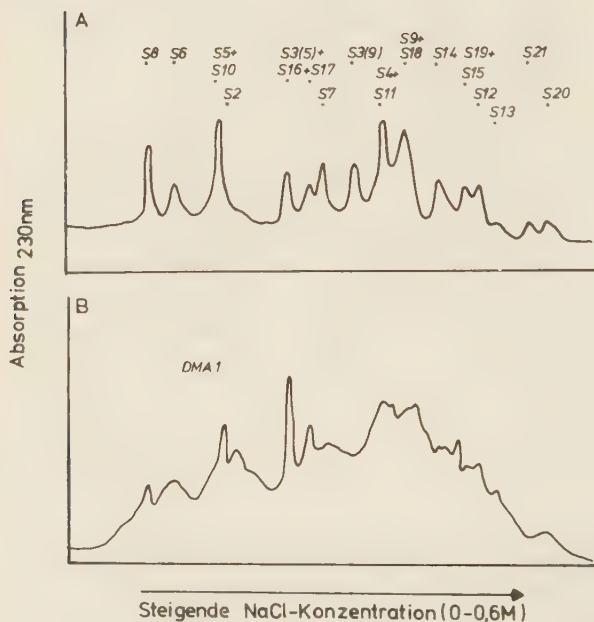
- A: Isolierter DMA 1-Komplex
- B: Isolierter DMA 1-Komplex zusammen mit dem Gesamtproteingemisch unbehandelter 30S Untereinheiten
- C: Gesamtproteingemisch unbehandelter 30S Untereinheiten
- D: Gesamtproteingemisch DMA-behandelter 30S Untereinheiten

DMA 1 ließ sich ebenfalls auf "Soft"- und "Hard"-Polyacrylamidgelen als Einzelbande auftrennen. (aus Lutter, Zeichhardt, Kurland und Stöffler, 1972)

##### Abb. 17. Immuno-Doppeldiffusionsteste mit DMA 1-Komplex

Isolierter DMA 1-Komplex wurde im Vergleich zu den unvernetzten Einzelproteinen S5 und S8 gegen Antiserum (As)-S5 (A) bzw. Antiserum (As)-S8 (B) getestet. Weitere Erklärungen s. im Text. (aus Lutter, Zeichhardt, Kurland und Stöffler, 1972)

Abb. 18. Separationseigenschaften der Proteine DMA-behandelter 30S Untereinheiten auf Cellulosephosphat-Ionenaustauschersäulen



A: Gesamtproteingemisch unbehandelter 30S Untereinheiten

B: Gesamtproteingemisch DMA-behandelter 30S Untereinheiten (5 mM DMA)



bildeten, durfte wie bereits für das Proteinpaar S18-S21 gefolgert werden, daß die Proteine in unvernetztem und verknüpftem Zustand gleich antigen wirken.

Drei weitere Antiseren führten zu schwachen Präzipitationen, jedoch ließ sich in jedem Fall ausschließen, daß die entsprechenden Proteine kovalent verbundene Komponenten des Komplexes waren:

1. Eins der vier DMA 1-Präparate reagierte zusätzlich mit Anti-S3 und Anti-S11. Die Einzelproteine S3 und S11 waren als gelegentlich auftretende Verunreinigungen in der Fraktion mit DMA 1 anzusehen, weil beide Reaktionen äußerst schwach verliefen und nur dieses eine Mal auftraten.
2. Jedes der vier Komplexpräparate reagierte schwach mit Anti-S1. Da jedoch das zuvor ermittelte Molekulargewicht von DMA 1 (ca. 38000 Dalton) wesentlich niedriger liegt als das von S1 (65000 Dalton), konnte S1 kein Bestandteil des Komplexes sein. Vielmehr war S1 eine Verunreinigung, die sich säulenchromatographisch nicht völlig von DMA 1 abtrennen ließ. Dieser Umstand erklärt sich wie folgt: Das hauptsächlich im Durchlauf einer Cellulosephosphat-Säule aufgetrennte Protein S1 wird auch in geringem Maße im Trennbereich des Kationenaustauschers separiert. Bei der Nachreinigung der Fraktion mit DMA 1 auf Sephadex G-100-Säulen werden der Komplex und S1 zusammen in der Nähe des Ausschlußvolumens eluiert. Die Kontamination der Komplexfraktion mit S1 ist so gering, daß sie nicht mehr gelelektrophoretisch zu erfassen, wohl aber immunologisch nachzuweisen ist.

#### II.2.2.2. Versuche mit radioaktiv markierten Untereinheiten

Im Folgenden werden Experimente vorgestellt, welche die direkte Identifizierung des kovalent verknüpften Proteinpaares S5-S8 ermöglichten, ohne daß der Komplex vorher aus dem Gesamtproteingemisch vernetzter Ribosomen isoliert werden mußte. Dazu wurden 30S Untereinheiten rekonstituiert, die entweder  $^3\text{H}$ -markiertes S5 oder  $^3\text{H}$ -S8 enthielten und unter entsprechenden Bedingungen wie die unmarkierten Subpartikel mit DMA inkubiert.

##### II.2.2.2.1. Gelelektrophoretische Darstellung des DMA 1-Komplexes

Der Proteinanteil DMA-behandelter 30S Untereinheiten wurde zum Vergleich mit unbehandelten Kontrolluntereinheiten auf "Hard"-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die gefärbten Gele wurden in Scheibchen von 1 mm Dicke zerschnitten, in "NCS Solubilizer" (Nuclear Chicago Corp.) aufgelöst und im Scintillationszähler auf Radioaktivität untersucht

(s. "Materialien und Methoden").

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Die Radioaktivität der Proteine  $^3\text{H}$ -S5 bzw.  $^3\text{H}$ -S8 wurde beim Test unbehandelter Subpartikel nur an den Positionen im Gel nachgewiesen, an denen S5 bzw. S8 regulär aufgetrennt wird (Abb. 19A u. C). Dagegen ergab die Analyse des Proteingemisches DMA-behandelter Untereinheiten folgendes (Abb. 19B u. D): Die Radioaktivität von  $^3\text{H}$ -S5 und  $^3\text{H}$ -S8 nahm in den Einzelproteinbanden stark ab. Zusätzlich trat in beiden Fällen an jeweils gleicher Position eine neue radioaktive Bande auf, die sich am selben Ort wie der angefärbte DMA 1-Komplex befand. Aufgrund gleicher Wanderungseigenschaften des angefärbten Komplexes, des Komplexes mit  $^3\text{H}$ -S5 und desjenigen mit  $^3\text{H}$ -S8 konnte gefolgert werden, daß S5 und S8 die vernetzten Komponenten von DMA 1 sind.

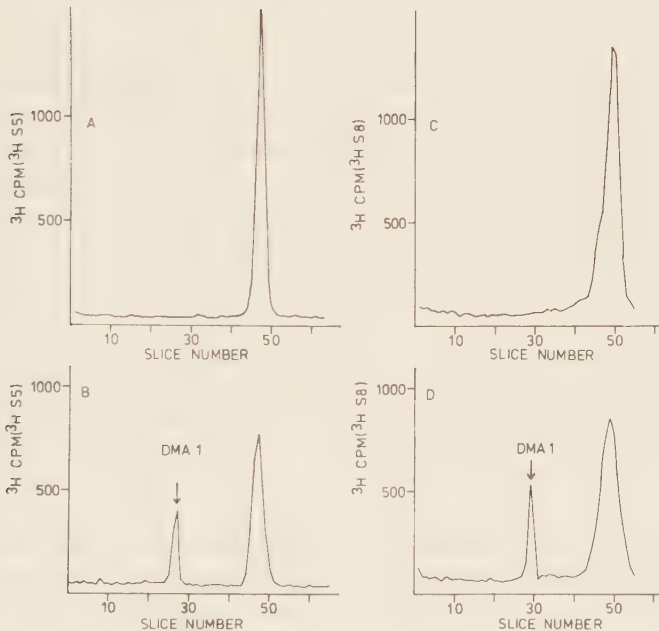
Der  $^3\text{H}$ -markierte DMA 1-Komplex enthielt jeweils 15-20% der Ausgangsaktivität von  $^3\text{H}$ -S5 bzw.  $^3\text{H}$ -S8. Mit Kenntnis der ursprünglichen spezifischen Aktivität von  $^3\text{H}$ -S5 (4800 dpm/ $\mu\text{g}$ ) und  $^3\text{H}$ -S8 (6700 dpm/ $\mu\text{g}$ ) konnte in drei unabhängig durchgeführten Experimenten bestimmt werden, daß das molare Verhältnis von S5:S8 im DMA 1-Komplex bei 0,76, 0,90 und 1,02 lag. S5 und S8 wurden also von DMA in einem Verhältnis von nahezu 1:1 vernetzt.

#### II.2.2.2.2. Immunologische Identifizierung des DMA 1-Komplexes

Ein IgG-Antikörper ist mit seinem Molekulargewicht von 150000 Dalton wesentlich größer als jedes der 21 ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit (MG 65000 - ca. 7000 Dalton). Auf Molekularsiebsäulen mit bestimmten Separationseigenschaften können deshalb lösliche 30S-Protein-Antikörper-Komplexe von jeweils unreaktierten Proteinen und Immunglobulinen abgetrennt werden. Das bedeutet im speziellen Fall, daß sich aus dem 30S-Gesamtproteingemisch eins der 21 Proteine durch die Reaktion mit seinen homologen Antikörpern in den Säulen-Trennbereich für hochmolekulare Komponenten verschieben läßt. Der eindeutige Nachweis dieser Verschiebung wird wesentlich erleichtert, wenn das antigene Protein radioaktiv markiert ist.

Bei einer derartigen Separation des Proteingemisches DMA-behandelter Untereinheiten mit einem  $^3\text{H}$ -Protein sind somit folgende Effekte zu erwarten: Liegt das markierte Protein unkomplexiert vor, werden einzig und allein seine homologen Immunglobuline abtrennbare  $^3\text{H}$ -Protein-Antikörper-Komplexe bilden. Ist das  $^3\text{H}$ -Protein dagegen zusammen mit einem anderen unmarkierten Protein Teil eines kovalent vernetzten Proteinpaares, dann werden zusätzlich die Antikörper gegen das unmarkierte Protein zu radioaktiven

Abb. 19. Fraktionierung von DMA 1-Komplex auf "Hard"-Polyacrylamidgelen



Die 30S Untereinheiten, die entweder  $^3\text{H-S5}$  oder  $^3\text{H-S8}$  enthielten, wurden mit 8 mM DMA behandelt. Der extrahierte 30S-Proteinanteil wurde mit unmarkiertem DMA 1-Komplex versetzt. Die Pfeile geben die Position der gefärbten Bande von DMA 1 an. (aus Lutter, Zeichhardt, Kurland und Stöffler, 1972)

- A: Protein unbehandelter 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H-S5}$
- B: Protein DMA-behandelter 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H-S5}$
- C: Protein unbehandelter 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H-S8}$
- D: Protein DMA-behandelter 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H-S8}$

Antigen-Antikörper-Komplexen führen. Es konnte also davon ausgegangen werden, daß der DMA 1-Komplex, bestehend aus S5- $^3\text{H}$ -S8, mit Hilfe von Anti-S8 und Anti-S5 im Ausschlußvolumen einer BioGel P 150-Säule von den unvernetzten Proteinen im eingeschlossenen Volumen abzutrennen ist. Ebenso sollte im reziproken Experiment der DMA 1-Komplex  $^3\text{H}$ -S5-S8 durch beide Antisera von allen unkomplexierten Proteinen separiert werden.

Vorversuche: Um für diese Studien die optimalen Konzentrationsverhältnisse zwischen Antigen und Antikörper zu bestimmen, wurden die beiden Seren Anti-S5 und Anti-S8 gegen 30S-Gesamtproteingemische mit  $^3\text{H}$ -S5 bzw.  $^3\text{H}$ -S8 titriert. Da die Proteinanteile rekonstituierter Subpartikel mit einem dieser markierten Proteine für die Voruntersuchungen zu kostbar waren, wurden  $^3\text{H}$ -S5 bzw.  $^5\text{H}$ -S8 zu Proteingemischen gegeben, die außer S5 oder S8 alle übrigen Proteine enthielten. Zum Zeitpunkt der Versuche ging man noch davon aus, daß die 30S Untereinheit in ihrer Proteinzusammensetzung stark heterogen ist, wie aus den ersten Untersuchungen über die stöchiometrischen Verhältnisse der 30S-Proteine in situ geschlossen worden war (Voynow und Kurland, 1971; Weber, 1972) (s. Abschnitt I.3.2.). Deshalb wurden die beiden  $^3\text{H}$ -Proteine ihrem jeweiligen stöchiometrischen Anteil entsprechend (Voynow und Kurland, 1971) zu den inkompletten Proteingemischen gegeben.

Gemische mit 2  $\mu\text{g}$   $^3\text{H}$ -S8 wurden mit steigenden Mengen Antiserum-S8 versetzt und nach einer Inkubation in Säulenpuffer II (mit 1% Rinderserumalbumin) auf BioGel P 150-Säulen aufgetrennt. Es zeigte sich, daß  $^3\text{H}$ -S8 optimal von den übrigen Proteinen abgetrennt werden konnte, wenn man 5  $\mu\text{l}$  Anti-S8/ $\mu\text{g}$  S8 einsetzte. Da die zu analysierenden Proben mit DMA 1 100  $\mu\text{g}$  30S-Gesamtprotein enthielten, war zu errechnen, welchen Anteil Protein S8 in dieser Menge 30S-Protein ausmacht. Unter Berücksichtigung des stöchiometrischen Anteils von S8 in der 30S Untereinheit (0,9 Kopien/30S) und des Molekulargewichts (17600 Dalton; Craven et al., 1969) ergab sich ein Wert von 6,3  $\mu\text{g}$  Protein S8/100  $\mu\text{g}$  30S-Gesamtprotein.<sup>\*)</sup> Für 6,3  $\mu\text{g}$  S8 mußten folglich 31,5  $\mu\text{l}$  Antiserum-S8 verwendet werden.

Eine entsprechende Titration wurde mit Anti-S5 gegen ein Proteingemisch mit 2  $\mu\text{g}$   $^3\text{H}$ -S5 durchgeführt. Sie ergab, daß man bei 7,7  $\mu\text{g}$  Protein S5/100  $\mu\text{g}$  30S-Gesamtprotein (0,8 Kopien/30S und 24000 Dalton für S5) 95  $\mu\text{l}$  Antiserum-S5 zur optimalen Separation von S5 benötigte.

\*) Molekulargewicht des Gesamtproteinanteils von 30S Untereinheiten 250000 Dalton

Die Titrationsversuche zeigten, daß die hier untersuchte Reaktion ein typisches Optimum aufweist, wie es für alle ausführlich charakterisierten Antigen-Antikörper-Systeme bekannt ist (zur Übersicht s. Heidelberger, 1935; Eisen, 1973). Auffallend war jedoch, daß in keinem Fall der gesamte Anteil der  $^3\text{H}$ -Proteine mit den Antikörpern reagierte: Eine komplette Verschiebung des radioaktiven Proteins ins Ausschlußvolumen der BioGel-Säule war nicht möglich; 60-70%ige Abtrennung waren die höchsten Werte, die erreicht werden konnten. Bei Einsatz höherer Antiserumkonzentrationen trat zwar eine Verringerung des radioaktiven Materials im eingeschlossenen Volumen auf, jedoch wurde gleichzeitig weniger Radioaktivität im Ausschluß nachgewiesen. Dieser Effekt dürfte darauf zurückzuführen sein, daß relativ hohe Serumkonzentrationen eine optimale Ausbildung von löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen nicht mehr zuließen. Es wurden vielmehr Präzipitate gebildet, die wegen ihrer Größe auf dem Auftrag der Molekularsiebsäulen liegen bleiben.

Identifizierung der Proteine im DMA 1-Komplex: Je 100  $\mu\text{g}$  Proteingemisch DMA-behandelter und unbehandelter 3CS Untereinheiten, die jeweils mit  $^3\text{H}$ -S8 rekonstituiert worden waren, wurden mit Antiserum-S5 bzw. -S8 inkubiert und über die BioGel-Säulen aufgetrennt. Wie erwartet, führte Anti-S8 in beiden Fällen zur Bildung abtrennbarer radioaktiver Antigen-Antikörper-Komplexe (nicht dargestellt). Dagegen verschob Anti-S5 keinerlei radioaktives Material unbehandelter Untereinheiten ins Ausschlußvolumen der Säule (Abb. 20A); Anti-S5 bewirkte nur bei der Inkubation mit dem Proteingemisch DMA-behandelter Ribosomen das Auftreten radioaktiver Fraktionen im Ausschluß (Abb. 20C). Da Anti-S5 bekanntlich keinerlei kreuzreagierende Aktivität für Protein S8 enthielt, konnte gefolgert werden, daß Anti-S5 mit einem aus S5- $^3\text{H}$ -S8 bestehenden Proteinpaar folgenden Antikörper-Antigen-Komplex gebildet hatte: Anti-S5-S5- $^3\text{H}$ -S8.

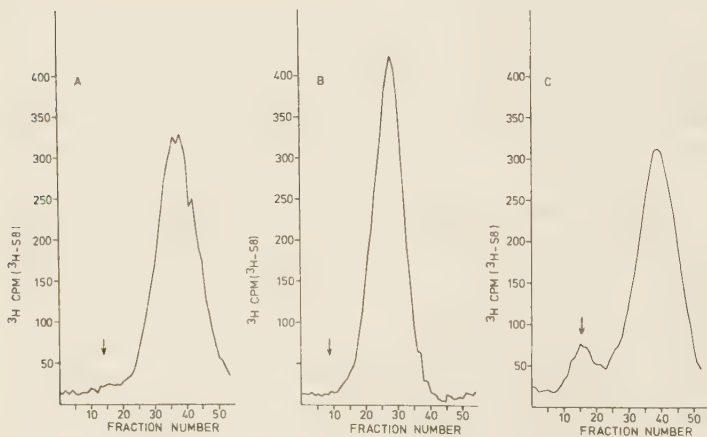
Reziproke Experimente mit Proteingemischen aus Untereinheiten, die  $^3\text{H}$ -S5 enthielten, ergaben entsprechende Ergebnisse. Anti-S8 verschob bei der Inkubation mit dem Proteinanteil unbehandelter Subpartikel keine Radioaktivität in den Ausschluß, bildete jedoch beim Test gegen Protein aus DMA-behandelten Untereinheiten radioaktive Antikörper-Antigen-Komplexe (Anti-S8-S8- $^3\text{H}$ -S5), die im Ausschlußvolumen der BioGel-Säulen eluiert wurden (nicht dargestellt).

Mit Hilfe dieser Methode konnte auch nachgeprüft werden, daß es sich bei

der im Immuno-Doppeldiffusionstest nachgewiesenen antigenen Aktivität von S1 in den DMA 1-Präparaten lediglich um eine unvernetzte Verunreinigung handelte (s. Abschnitt II.2.2.1.2.). Dazu wurde das Gesamtproteingemisch DMA-behandelter 30S Untereinheiten, die  $^3\text{H}$ -S8 enthielten, mit Antiserum-S1 inkubiert<sup>+)</sup>  und säulenchromatographisch separiert. Anti-S1 bewirkte erwartungsgemäß keine Abtrennung des Komplexes mit  $^3\text{H}$ -S8 in das Ausschlußvolumen der Säule (Abb. 20B).

<sup>+)</sup>  Zur optimalen Abtrennung von Protein S1, das in 100  $\mu\text{g}$  30S-Gesamtprotein 3,6  $\mu\text{g}$  ausmacht (0,14 Kopien/30S und MG 65000 Dalton für S1), wurden 20  $\mu\text{l}$  Antiserum-S1 verwendet.

Abb. 20. Fraktionierung von Protein-Antikörper-Komplexen über BioGel P150-Säulen zur Identifizierung von DMA 1



Der Proteinanteil DMA-behandelter 30S Untereinheiten, die  $^3\text{H}$ -S8 enthielten, wurde mit Antiserum gegen ribosomale Einzelproteine inkubiert und über BioGel P150-Säulen fraktioniert. Weiteres s. im Text. (aus Lutter, Zeichhardt, Kurland und Stöffler, 1972)

- A: Proteinanteil un behandelter 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H}$ -S8, inkubiert mit Antiserum-S5  
 B: Proteinanteil DMA-behandelter 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H}$ -S8, inkubiert mit Antiserum-S1  
 C: Proteinanteil DMA-behandelter 30S Untereinheiten mit  $^3\text{H}$ -S8, inkubiert mit Antiserum-S5

Die Pfeile geben das Ausschlußvolumen der Säulen an.



## II.3. Diskussion

### II.3.1. Eigenschaften und Limitationen der Vernetzungstechnik und Charakterisierungsmethoden

#### Vernetzungstechnik

Es ist bekannt, daß PDM und DMA mit den Aminosäuren Cystein bzw. Lysin spezifisch reagieren (zur Übersicht s. Wold, 1967). Dennoch wurde in Vorversuchen nachgeprüft (Lutter, 1973), ob unter den in "Materialien und Methoden" angegebenen Bedingungen die Reagenzien - aufgrund etwaiger zusätzlicher Spezifität für Nukleinsäuren - Verknüpfungen zwischen Proteinen und rRNS hervorrufen. Zu diesem Zweck wurden  $^3\text{H}$ -Lysin-markierte 30S Untereinheiten mit PDM bzw. DMA behandelt und anschließend einer Zentrifugation über Rohrucker-Dichtegradienten, die 0,4% SDS enthielten, unterzogen. In beiden Fällen wiesen die RNS-Fractionen keinerlei Radioaktivität auf; die Proteine waren also völlig von der RNS dissoziiert (Lutter, 1973). Obwohl diese Ergebnisse eine Reaktion mit RNS nicht mit Sicherheit ausschließen, zeigen sie doch klar, daß keine Protein-RNS-Vernetzungen auftreten.

Ebenso war zu belegen, daß bei der Inkubation von 30S Untereinheiten mit bifunktionellem Reagens keine interribosomalen Vernetzungen gebildet werden. Mittels Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation ließ sich nachweisen, daß PDM- und DMA-behandelte Untereinheiten wie unbehandelte Kontrollribosomen sedimentieren; es wurden keine Untereinheitenaggregate beobachtet (Lutter, 1973).

Reaktionsprodukte, bei denen zwei Aminosäurereste eines Proteins verbunden sind oder das Reagens nur mit einer funktionellen Gruppe reagiert hat, sind vorstellbar, waren jedoch nicht zu bestimmen.

Die Versuche mit den rekonstituierten radioaktiven 30S Untereinheiten, die also entweder  $^3\text{H}$ -S5 oder  $^3\text{H}$ -S8 enthielten, ergaben, daß S5 und S8 nur zu maximal 20% durch DMA vernetzt werden. Für den S18-S21-Komplex liegen keine derartigen Abschätzungen vor, jedoch ist anzunehmen, daß S18 und S21 durch PDM in noch geringerem Maße verknüpft wurden, weil die Gesamtausbeute des Komplexes S18-S21 unter der von S5-S8 lag. Da, wie schon mehrfach erwähnt, nur ein relativ kleiner Teil der Ribosomen in einer gegebenen Population funktionell aktiv ist (Gilbert, 1963), stellte sich die Frage, ob die bifunktionellen Reagenzien möglicherweise lediglich mit dem inaktiven Anteil

der 30S Untereinheiten reagieren. Bestimmungen der funktionellen Aktivität PDM- und DMA-behandelter Subpartikel (s. "Materialien und Methoden") bei der Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Synthese zeigten, daß dies nicht der Fall ist. Im Vergleich zu unbehandelten Subpartikeln waren mit PDM inkubierte Untereinheiten nur noch zu 5% aktiv, während DMA-behandelte Untereinheiten eine Einbaurrate von 50% aufwiesen (Lutter, 1973). Diese Befunde erlauben zwar den Schluß, daß funktionell aktive Ribosomen mit PDM bzw. DMA reagieren, besagen jedoch nicht mit Sicherheit, daß auch die Proteinverknüpfung an aktiven Untereinheiten geschieht. Es wäre nämlich möglich, daß lediglich eine Modifikation der Untereinheiten ohne gleichzeitige Proteinvernetzung zur Inaktivierung führt und daß erst danach Proteine in den - unter Umständen strukturell desintegrierten - Subpartikeln durch die Reagenzien verknüpft werden.

Da sich auf diese Weise keine Aussagen über Proteinnachbarschaften in funktionstüchtigen Ribosomen gewinnen ließen, wurde von Lutter und Kurland (1973) ein anderer Weg gegangen. Den Autoren gelang es, den Komplex S5-S8 anstelle der unvernetzten Proteine S5 und S8 in strukturell intakte 30S Untereinheiten zu rekonstituieren. Diese Subpartikel waren im In vitro-Peptidsynthese-System nahezu gleich aktiv wie Kontrolluntereinheiten mit unbehandelten Proteinen. Daraus konnte geschlossen werden, daß die durch die Vernetzung zwischen S5 und S8 fixierte Nachbarschaft auch während der Proteinbiosynthese erhalten bleibt.

PDM und DMA sind kleine Reagenzien. Wie schon für die nichtenzymatischen Modifikationsexperimente bei der Untersuchung der Proteinzugänglichkeit besprochen, ist nicht auszuschließen, daß Reagenzien geringer Größe in das Ribosomeninnere diffundieren (s. Abschnitt I.3.5.3.). Obwohl aus diesem Grunde PDM und DMA nicht als Oberflächenreagenzien angesehen werden können, sind Vernetzungen direkt im Zentrum des Ribosoms nicht sehr wahrscheinlich: Unter der Voraussetzung, daß eine mögliche Diffusion eines bifunktionellen Reagens' in das Ribosom langsamer ist als die Wechselwirkung zwischen Reagens und Aminosäureseitenkette, ist anzunehmen, daß mindestens eine der beiden funktionellen Gruppen noch in der Nähe der Ribosomenoberfläche reagiert.

#### Charakterisierungsmethoden

Die Wahl der Methoden richtete sich danach, ob unmarkierte oder radioaktiv markierte Ribosomen verwendet wurden. Bei den Untersuchungen mit unmarkierten Ribosomen bedurfte es zur Identifizierung der vernetzten Proteinpaare

gelelektrophoretischer, säulenchromatographischer und immunologischer Techniken. Die Elektrophorese und Chromatographie dienten dabei dem Nachweis und der Isolierung der Komplexe. Mit diesen beiden Methoden ließen sich einige Komplexeigenschaften bestimmen, die auf einer Kombination physikalisch-chemischer Einzelmerkmale der unverknüpften Proteine beruhen:

Bei der Auftrennung der Proteine über Cellulosephosphat-Säulen zeigte sich, daß die Komplexe S18-S21 (PDM 1) und S5-S8 (DMA 1) solche Ladungsbeschaffheiten haben, daß sie jeweils zwischen den unvernetzten Proteinen separiert werden. In keinem Fall ist jedoch der Komplex genau in einer Mittelposition aufgetreten, sondern stets in der Nähe eines der Einzelproteine.

Die experimentell ermittelten Molekulargewichte von PDM 1 und DMA 1 liegen im Bereich der Werte, die sich mit Hilfe der in der Literatur angegebenen Molekulargewichte für die unverknüpften Proteine errechnen lassen (Tabelle 25a u. b). Da aber letztere Werte einerseits je nach berücksichtigter Bestimmungsmethode schwanken und andererseits für mehrere Proteine sehr ähnlich sind, ist eine Übereinstimmung der experimentellen mit den errechneten Komplex-Molekulargewichten nicht als Kriterium gewertet worden, um vor der eigentlichen Identifizierung der vernetzten Proteine Aussagen über potentielle Partner in den Komplexen zu machen.

Für PDM 1 konnte aufgrund äußerst geringer Ausbeute das Molekulargewicht nicht wie für DMA 1 mittels SDS-Gelelektrophorese festgestellt werden. Da aber PDM 1 und S9 auf Sephadex G-100-Säulen gemeinsam aufgetrennt werden (s. Abb. 14), sollte das Molekulargewicht des Proteinpaares etwa dem von S9 entsprechen. Berücksichtigt man von allen errechneten Werten für PDM 1 in erster Linie das aus den Aminosäuresequenzen von S18 und S21 abgeleitete Molekulargewicht<sup>\*)</sup>, so zeigt sich für dieses und das experimentelle Komplex-Molekulargewicht eine annähernde Übereinstimmung; das mit Hilfe der Sephadex-Chromatographie ermittelte Molekulargewicht liegt jedoch um ca. 15% unter dem des errechneten (Tabelle 25b). Vergleichsweise zu niedrige experimentelle Komplex-Molekulargewichte, wenn auch in unterschiedlichem Maße, ergeben sich bei jeder

---

<sup>\*)</sup> Aus den Aminosäuresequenzen abgeleitete Molekulargewichte geben die exakten Werte wieder: Sie werden direkt aus den absoluten Anteilen der einzelnen Aminosäuren in den Proteinen berechnet und sind somit im Gegensatz zu experimentell bestimmten frei von methodisch bedingten Abweichungen.

Tabelle 25. Aus den Molekulargewichten der Einzelproteine errechnete  
Komplex-Molekulargewichte im Vergleich zu den experimentell bestimmten  
Werten

a. S5-S8 (DMA 1)

| Protein | SDS <sup>a</sup> | SDS <sup>b</sup> | Equi. <sup>a</sup> | Equi. <sup>c</sup> | Chem. <sup>c</sup> | Sequenz            |
|---------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| S5      | 19600            | 20200            | 18500              | 24000              | 16200              | -                  |
| S8      | 15500            | 14100            | 15500              | 17600              | 19000              | 12255 <sup>d</sup> |
| S5+S8   | 35100            | 34300            | 34000              | 41600              | 35200              | -                  |

Mittels SDS-Gelelektrophorese bestimmtes Molekulargewicht von S5-S8:  
ca. 38000 Dalton

b. S18-S21 (PDM 1)

| Protein | SDS <sup>a</sup> | SDS <sup>b</sup> | Equi. <sup>a</sup> | Equi. <sup>c</sup> | Chem. <sup>c</sup> | Sequenz            |
|---------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| S18     | 12200            | 11000            | 10500              | 14600              | 11000              | 8951 <sup>e</sup>  |
| S21     | 12200            | 19700            | 13500              | 13000              | 15700              | 8359 <sup>f</sup>  |
| S18+S21 | 24400            | 30700            | 24000              | 27600              | 26700              | 17310              |
| S9      | 16200            | 16200            | 14500              | 21000              | 13500              | 14569 <sup>g</sup> |

S18-S21 wird auf Sephadex G-100-Säulen zusammen mit S9 aufgetrennt;  
deshalb entspricht das Molekulargewicht des Komplexes etwa dem von S9.

<sup>a</sup> Dzionara et al., 1970

<sup>b</sup> Traut et al., 1969

<sup>c</sup> Craven et al., 1969

<sup>d</sup> Stadler, 1974

<sup>e</sup> Yaguchi, 1975

<sup>f</sup> Vandekerckhove et al., 1975

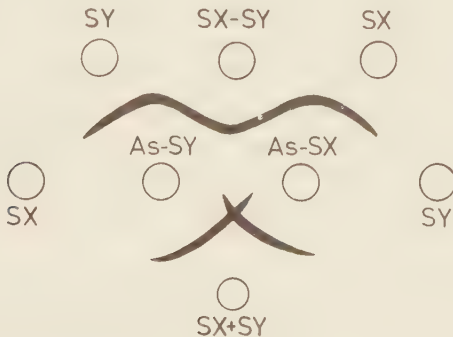
<sup>g</sup> Chen und Wittmann-Liebold, 1975

Methoden: SDS : SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese  
Equi. : Gleichgewichtssedimentation  
Chem. : Berechnung aus der Aminosäurekomposition  
Sequenz: Berechnung aus der Aminosäuresequenz

berücksichtigten Bestimmungsmethode. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß PDM 1 mit S18 das ribosomale Protein mit dem größten Anteil aromatischer Aminosäuren enthält (Craven et al., 1969; Kaltschmidt et al., 1970). Bekanntlich werden aromatische Proteine auf Sephadex verzögert aufgetrennt und somit später eluiert, als ihrem tatsächlichen Molekulargewicht entspricht (s. Informationsschrift über Sephadex-Chromatographie von Pharmacia Fine Chemicals, Schweden, 1972).

Zwei Voraussetzungen müssen, wie bereits ausgeführt, von den Komplexen aus unmarkierten Ribosomen erfüllt sein, wenn mit Hilfe der Immuno-Doppeldiffusion eine erste Identifizierung eines Proteinpaares durchgeführt werden soll: Erstens darf die Antigenität der komplexierten Proteine nicht verlorengehen und zweitens sind die Komplexe aus dem Gesamtproteinmisch aus isolieren. Ein hoher Reinheitsgrad der Komplexfraktionen - oder zumindest die Kenntnis der möglichen Verunreinigung - ist erforderlich, weil mit Hilfe der Antikörper selbst geringste Kontaminationen, die gelelektrophoretisch und säulenchromatographisch nicht mehr nachzuweisen sind, noch erfaßt werden können. Es ist offensichtlich, daß eine stark antigen wirkende Verunreinigung in einer Komplexfraktion die Identifizierung vernetzter Proteine verfälschen würde.

Weniger strenge Reinheitskriterien für die Komplexe wären nötig, wenn man statt der in den Abbildungen 15 und 17 vorgestellten Versuchsanordnung folgendes Muster anwendete:



Bei diesen Tests könnte unterschieden werden, ob ein in der Komplexfraktion nachgewiesenes Protein Bestandteil des Komplexes oder eine unverknüpfte Verunreinigung ist: Ein Gemisch aus jeweils unvernetztem SX und SY würde

bei der Inkubation gegen Antiserum (As)-SX und Antiserum (As)-SY Präzipitationslinien bilden, die nicht fusionieren sondern sich vollkommen überkreuzen sollten, während die Linien des Komplexes SX-SY völlig fusionieren dürften (für ein Beispiel s. Lutter et al., 1974a). Da derartige Experimente aber umfangreiche Titrierungsversuche voraussetzen, konnten sie wegen der geringen Komplexausbeuten bei den Untersuchungen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Anhand von DMA 1 wurde demonstriert, daß die Versuche mit radioaktiv markierten 30S Untereinheiten die Identifizierung eines Proteinpaares ohne vorherige Isolierung aus dem Gesamtproteingemisch ermöglichen. Um bei der Rekonstitution ein  $^3\text{H}$ -markiertes Protein gezielt einsetzen zu können, bedarf es jedoch der Kenntnis der vernetzbaren Proteine. Dies wiederum ergeben die Versuche mit den unmarkierten Subpartikeln.

Die "Hard"-gelelektrophoretische Auftrennung und die säulenchromatographische Separation von 30S-Protein-Antikörper-Komplexen eignen sich gleichermaßen zur Identifizierung vernetzter Proteine. Eine Absicherung der Ergebnisse läßt sich für beide Methoden durch folgendes erzielen:

1. Bei der Gelelektrophorese könnte ein Komplex, der ähnliches Separationsverhalten wie DMA 1 hat und sich aus einem der beiden  $^3\text{H}$ -Proteine sowie einem dritten unmarkierten Protein zusammensetzt, vom DMA 1-Komplex überlagert werden. Da jedoch eine derartige Überlagerung in einem anderen Gel-system mit unterschiedlichen Trenneigenschaften aufgehoben sein sollte, sind die Proteine DMA-behandelter Untereinheiten zur Kontrolle z.B. auf SDS-Gelen zu separieren. Es konnte gezeigt werden, daß auch unter diesen Bedingungen nur ein einziger Komplex auftritt.
2. Die immunologischen Versuche erlauben den eindeutigen Nachweis darüber, daß der Komplex nur zwei Proteine enthält: Außer den Antikörpern gegen die beiden Proteine des  $^3\text{H}$ -markierten Komplexes bewirkt kein anderes Antiserum die Bildung radioaktiver Antigen-Antikörper-Komplexe. Das wurde beispielsweise bei den Versuchen mit Anti-S1 belegt (s. Abb. 20).

Aus dem zuvor Besprochenen ergibt sich, daß aufgrund der Voraussetzungen, Eigenschaften und Limitationen der hier verwendeten Methoden erst eine Kombination mehrerer Techniken eine wirklich sichere Charakterisierung eines Komplexes ermöglicht.



### II.3.2. Vernetzungsexperimente anderer Autoren

Insgesamt 11 verschiedene Vernetzungsreagenzien sind bisher von mehr als 20 Arbeitsgruppen zur Bestimmung von Proteinnachbarschaften im Ribosom verwendet worden (Tabelle 26). Am häufigsten wurden dabei Verknüpfungen zwischen 30S-Proteinen untersucht; ca. 20 Proteinpaare sind bislang bekannt. Weiterhin konnten Vernetzungen zwischen Proteinen der 50S Untereinheit, zwischen Proteinen der 30S und 50S Subpartikel sowie zwischen Initiations- bzw. Elongationsfaktoren und ribosomalen Proteinen ermittelt werden. Es sind im wesentlichen zwei Wege zur Identifizierung verknüpfter Proteine eingeschlagen worden: Je nach gewähltem Reagens wurden entweder die Proteine in vernetztem Zustand direkt bestimmt oder die Komplexe erst gespalten und die Charakterisierung dann an Hand der resultierenden Einzelproteine durchgeführt.

S5-S8 und S18-S21 gehören zu den weitestgehend untersuchten Komplexen. Diese beiden Proteinpaare wurden mit zum Teil unterschiedlichen Reagenzien unter Einsatz sowohl verschiedener als auch derselben Methoden identifiziert. An Hand dieser Komplexe werden im Folgenden fast alle getesteten Reagenzien und angewendeten Identifizierungsmethoden vorgestellt (Tabelle 26a u. b).

#### a. Vernetzung von S5 mit S8

##### Charakterisierung von ungespaltenem Komplex

Methode a: Die Kombination der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen gelelektrophoretischen, säulenchromatographischen und immunologischen Identifizierungstechniken wird in Tabelle 26a als "Methode a" bezeichnet (s. Abschnitt II.2.2.). Bode et al. (1974) charakterisierten mit Hilfe dieser sehr sicheren Methode einen S5-S8-Komplex, der durch Dimethylsuberimidat (DMSub) vernetzt war. Dieser bifunktionelle Imidoester ist dem in dieser Arbeit verwendeten DMA ähnlich; DMS hat jedoch zwischen seinen beiden reaktiven Gruppen einen Abstand von 12Å, während für DMA der Abstand bei 9Å liegt.

Die von Lutter und Kurland (1973) angewendete Technik, mit der sich die Rekonstituierbarkeit von S5-S8 in strukturell und funktionell intakte Untereinheiten nachweisen ließ (s. Abschnitt II.3.1., S. 156), wird in Tabelle 26a als "Methode b" bezeichnet, ist jedoch im engeren Sinne keine Identifizierungsmethode. Mit ihr werden vielmehr bereits charakterisierte Komplexe

dahingehend weiteruntersucht, ob die Proteinnachbarschaft auch im Verlauf der Proteinbiosynthese erhalten bleibt.

Methode c: Ebenfalls immunologisch wurde ein durch DMSub vernetzter S5-S8-Komplex identifiziert (Sun et al., 1974a; Tabelle 26a). Das Gesamtproteingemisch DMSub-behandelter 30S Untereinheiten, die in ihrem Proteinanteil  $^{35}\text{S}$ -markiert waren, wurde mit Hilfe von eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, der gebildete radioaktive Komplex aus dem Gel eluiert und anschließend mit Hilfe von Antiseren gegen ribosomale Einzelproteine in Radioimmuno-Doppeldiffusionsversuchen identifiziert. Die Versuchsanordnung bei den Diffusionstesten entsprach im wesentlichen der in der vorliegenden Arbeit. "Methode c" ist bei alleiniger Anwendung nur bedingt als sichere Standardtechnik anzusehen. Wie bereits besprochen, kann die Aussagekraft der Immuno-Diffusionsversuche unter bestimmten Umständen eingeschränkt sein (s. Abschnitt II.3.1.).

#### Charakterisierung von gespaltenem Komplex

Methode d: Proteinaggregate, die durch bifunktionelle Imidoester wie DMA, DMSub oder aber das 6 Å große Dimethylsuccinimidat (DMSuc) gebildet werden, können mittels Ammoniakbehandlung gespalten werden. Diese Eigenschaft machten sich zwei Arbeitsgruppen zunutze, die aus 30S Untereinheiten mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem Proteinanteil den S5-S8-Komplex durch zweidimensionale Harnstoff- oder SDS-Gelelektrophorese von weiteren Aggregaten und unvernetzten Proteinen separierten und anschließend aus dem Gel isolierten (Clegg und Hayes, 1974; Barritault et al., 1975; Barritault und Expert-Bezançon, 1975; Tabelle 26a). Nach der Komplexspaltung durch Ammoniak wurden die beiden radioaktiv markierten Einzelproteine mit zweidimensionaler Harnstoff-Gelelektrophorese charakterisiert. Aus der Übereinstimmung, die zwischen dem experimentell ermittelten Komplex-Molekulargewicht und dem zu errechnenden Molekulargewicht aus den Literaturwerten für die Einzelproteine gefunden wurde, schloß man, daß S5 und S8 im Komplex vorliegen.

Durch diese Untersuchungen ließen sich außerdem zwei Komplexe nachweisen, die neben S5 und S8 noch ein zusätzliches Protein enthalten: S5-S8-S15 oder -S16 oder -S17, S4-S5-S8 (Barritault et al., 1975; Barritault und Expert-Bezançon, 1975; Tabelle 26a). Diese Ergebnisse sind jedoch durch folgendes eingeschränkt: 1. Für Komplexe mit mehr als zwei Proteinen gilt allgemein, daß sie im Gegensatz zu Proteinpaaren nichts darüber aussagen, welches Protein mit welchem anderen vernetzt ist, sondern lediglich die

Proteinzusammensetzung der Aggregate wiedergeben. 2. Da im ersten Komplex das dritte Protein neben S5 und S8 eins von drei Proteinen sein kann, ist dieses Resultat nur als vorläufig anzusehen.

"Methode d" erwies sich nicht in allen Versuchen als eine sichere Charakterisierungsmethode. So wurden bei Untersuchungen mit 30S bzw. 50S Untereinheiten Komplexfraktionen nachgewiesen, die jeweils mehrere Proteine enthielten (S6, S13, S18, S19; L5, L10, L11, L13; L9, L10, L11) (Clegg und Hayes, 1974). Dabei lagen die experimentell bestimmten Molekulargewichte der Komplexe in allen drei Fällen bei weitem niedriger, als die jeweils summierten Molekulargewichte der ermittelten Einzelproteine erwarten ließen. Für die Komplexfraktion mit den vier 30S-Proteinen konnte mit einiger Sicherheit gefolgert werden, daß sich zwei Komplexe (S6-S18 und S13-S19) überlagerten (Tabelle 26c). Ein solcher Schluß war aber für die beiden 50S-Aggregate nicht möglich. Die Autoren nahmen deshalb an, daß L5-L10-L11-L13 und L9-L10-L11 große Komplexe sind (Tabelle 26d), die jeweils abnormes elektrophoretisches Trennverhalten haben. Zusätzlich muß in Betracht gezogen werden, daß die aus der Literatur berücksichtigten Molekulargewichte für die Einzelproteine experimentell bestimmt wurden und nicht auf Aminosäuresequenzuntersuchungen basieren. Wie bereits ausgeführt, können erstere Werte starke Abweichungen sowohl untereinander als auch von den exakten sequenzabgeleiteten Molekulargewichten aufweisen (s. Abschnitt II.3.1.).

Methode e: Bifunktionelle Weinsäurederivate, die mit  $\text{NH}_2$ -Gruppen spezifisch reagieren, wurden als weitere spaltbare Reagenzien verwendet (Lutter et al., 1974b; Tabelle 26a). Das Gesamtproteingemisch von unmarkierten 30S Untereinheiten, die entweder mit Tartryldiazid (TDA) (6Å Abstand zwischen den reaktiven Gruppen), Tartryldi(glycylhydrazid) (TDGA) (13Å Abstand) oder mit Tartryldi(ε-aminocaproylhydrazid) (TDCA) (23Å Abstand) behandelt worden waren, wurden säulenchromatographisch und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Komplexfraktion mit S5 und S8 wurde isoliert und einer zweidimensionalen, symmetrischen<sup>\*)</sup> SDS-Gelelektrophorese unterzogen, in deren Verlauf - nach Auftrennung in der ersten Dimension - der Komplex im Gel durch Perjodat gespalten wurde. Die anschließende Separation in der zweiten Dimension erlaubte die Identifizierung der resultierenden Einzelproteine. Isolierter, ungespaltenen Komplex wurde außerdem mit Antiseren gegen ribosomale Einzelproteine in Immuno-Doppeldiffusionstesten charakterisiert. Aufgrund der

<sup>\*)</sup> Beide Dimensionen weisen gleiche Trennbedingungen auf.

Kombination von zwei Einzeltechniken kann diese Methode als sehr sicher angesehen werden.

Methode f: Sun et al. (1974a) inkubierten  $^{35}\text{S}$ -markierte Untereinheiten mit Methyl 4-Mercaptobutyrimidat (MMBI) (Tabelle 26a). Dieses Reagens, das zuerst über seine Imidatgruppe an Proteine mit zugänglichem Lysin gebunden wird, bildet unter milden oxydierenden Bedingungen Disulfidbrücken zwischen zwei MMBI-Molekülen aus, die mit  $\text{NH}_2$ -Gruppen - nicht weiter als  $17\text{\AA}$  voneinander entfernt - reagiert haben. Der durch MMBI vernetzte radioaktive S5-S8-Komplex wurde mittels eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese von weiteren Proteinaggregaten und unvernetzten Proteinen abgetrennt, aus dem Gel eluiert und anschließend reduktiv gespalten. Die Spaltprodukte wurden durch erneute eindimensionale SDS-Gelelektrophorese identifiziert, wobei die Übereinstimmung des Molekulargewichts des Komplexes mit der Summe der Molekulargewichte der Einzelproteine als wesentlicher Hinweis für die Verknüpfung von S5 mit S8 beurteilt wurde. Die Proteinzusammensetzung des ungespaltenen Komplexes wurde immunologisch in Radioimmuno-Doppeldiffusionstesten bestimmt.

Der Molekulargewichtsvergleich erscheint bei dieser Methode zulässig, weil sowohl die Werte der Spaltprodukte als auch die der Komplexe mit Hilfe derselben Versuchstechnik parallel bestimmt werden; er kann bei Proteinen mit ähnlichen Molekulargewichten jedoch nur bedingt durchgeführt werden, weil derartige Proteine bei der SDS-Gelelektrophorese nicht oder ungenügend aufzutrennen sind. Trotz dieser Einschränkung ist "Methode f" insgesamt zuverlässig, weil zwei voneinander unabhängige Einzeltechniken angewendet werden.

Methode g: Sommer und Traut (1974, 1975) benutzten ebenfalls MMBI (Tabelle 26a). Sie trennten das Gesamtproteingemisch behandelter  $^{35}\text{S}$ -markierter 30S Untereinheiten mit Hilfe einer zweidimensionalen, symmetrischen SDS-Gelelektrophorese auf, die der von Lutter et al. (1974b) entwickelten SDS-Gelelektrophorese-Technik sehr ähnlich ist. Nach der Separation des Proteingemisches in der ersten Dimension wurden die durch das Reagens vernetzten Proteine im Gel reduktiv gespalten. Die in der zweiten Dimension folgende Elektrophorese ermöglichte die Auftrennung der durch die Reduktion erhaltenen Einzelproteine. Diese Proteine wurden aus den Gelen isoliert und durch zweidimensionale Harnstoff-Gelelektrophorese identifiziert. S5 und S8 ließen sich dadurch eindeutig als Bestandteile eines der zahlreich gebildeten Komplexe bestimmen. Für die Identifizierung des Komplexes diente die

Übereinstimmung des Wertes für das Molekulargewicht des Aggregats mit der Summe der im selben Versuch ermittelten Molekulargewichte für die Einzelproteine als wichtiges Kriterium.

Mehr als 10 weitere Proteinkomplexe konnten auf die soeben beschriebene Weise identifiziert werden (Tabelle 26b u. c). Da diese Methode in mehreren Fällen Resultate erbrachte, die sich mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit anderen zuverlässigen Techniken decken, dürfte auch sie als sicher angesehen werden. (Eine völlige Übereinstimmung mit Daten anderer Studien ist nicht zu erwarten, weil MMBI nur in Verbindung mit "Methode g" (und "f") verwendet wurde.) In weiterführenden Versuchen mußte "Methode g" jedoch teilweise abgewandelt werden. Die Komplexe wurden vor ihrer gelelektrophoretischen Identifizierung fraktioniert, um eine Überlagerung mehrerer Aggregate sowie der Einzelproteine nach der Komplexspaltung auszuschließen (s. Tabelle 26c, z.B. S3-S4, S3-S10, S6-S18; zitiert in Sommer und Traut, 1975).

#### b. Vernetzung von S18 mit S21

Die Verknüpfbarkeit von S18 mit S21 im intakten Ribosom wird ebenfalls von mehreren Autoren berichtet (Tabelle 26b). Chang und Flaks (1972), Kurland et al. (1972b) und Shih und Craven (1973) untersuchten jeweils ungespaltenen Komplex, während Sommer und Traut (1974) die Analyse des Proteinpaares an den Spaltprodukten vornahmen. Die Resultate der beiden ersten Arbeitsgruppen, die PDM verwendeten, bildeten die Grundlage für die in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen des S18-S21-Komplexes.

#### Charakterisierung von ungespaltenem Komplex

Methode h: Diese in der vorliegenden Arbeit beschriebene Identifizierungsmethode ermöglichte, den PDM-vernetzten S18-S21-Komplex säulenchromatographisch zu isolieren und mit Antiseren gegen ribosomale Einzelproteine in Immuno-Doppeldiffusionsversuchen zu charakterisieren (s. Abschnitt II.2.1. und Tabelle 26b). Es wurde bereits ausgeführt, daß die Doppeldiffusionstechnik unter bestimmten Bedingungen in ihrer Aussagekraft eingeschränkt sein kann (s. II.3.1.). Deshalb sollte sie zur standardmäßigen Komplexcharakterisierung zusammen mit einer anderen Technik angewendet werden.

Methode i: Chang und Flaks (1972) zeigten mit Hilfe eindimensionaler Gelelektrophorese, daß 1. die Trennungsbänder der Proteine S18 und S21 PDM-modifizierter 30S Untereinheiten im Vergleich zum Proteinseparationsmuster



unbehandelter Kontrollribosomen in ihrer Intensität deutlich vermindert sind und 2. an der gemeinsamen Position der Proteine S4, S5 und S8 eine zusätzliche Komponente auftritt. Zweidimensionale Gelelektrophorese ergab, daß dieses Proteinaggregat auch in der zweiten hauptsächlich nach Molekulargewicht trennenden Dimension wie Protein S4 wandert. Aufgrund der Verringerung der Trennungsbanden von S18 und S21 nach PDM-Modifikation und - unter Berücksichtigung von Literaturdaten - der Übereinstimmung des Molekulargewichts von Protein S4 mit der Summe der Molekulargewichte von S18 und S21 folgerten die Autoren, daß diese beiden ribosomalen Proteine in situ vernetzt werden und somit im Ribosom benachbart vorliegen. Zwar deckt sich dieser Befund mit den Daten der vorliegenden Arbeit sowie den Ergebnissen anderer Autoren, jedoch kann er wegen der fehlenden Identifizierung der im Komplex vernetzten Proteine nur als Hinweis für die Verknüpfung zwischen S18 und S21 gewertet werden. "Methode i" ist deshalb im engeren Sinne keine Charakterisierungsmethode.

Methode j: Das Proteinpaar S18-S21 wurde zuerst von Kurland et al. (1972b) eindeutig identifiziert (Tabelle 26b). 30S Untereinheiten, die aus  $^{14}\text{C}$ -markiertem S18,  $^3\text{H}$ -markiertem S21, den übrigen 19 unmarkierten Proteinen und 16S RNS rekonstituiert worden waren, wiesen nach PDM-Behandlung einen doppelmarkierten, kovalent vernetzten S18-S21-Komplex auf, der mit Hilfe eindimensionaler Gelelektrophorese nachzuweisen war. Diese Doppelmarkierungsmethode gilt als äußerst sicher, wenngleich sie sich aufgrund des aufwendigen Rekonstitutionsschrittes nicht zur standardmäßigen Komplexidentifizierung eignet.

Methode k: Tetranitromethan - ein Reagens, das durch Cysteinoxydation die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen engbenachbarten Cysteinen bewirkt - wurde von Shih und Craven (1973) verwendet (Tabelle 26b). Sowohl ein- als auch zweidimensionale Gelelektrophorese ergab, daß das Trennungsverhalten der Proteine S11, S12, S18 und S21 durch die Modifikation von 30S Untereinheiten verändert ist. Von mehreren aufgetretenen Proteinaggregaten wurde eins nach Isolierung tryptisch verdaut. Nach Vergleich mit den Hydrolyseprodukten ribosomaler Einzelproteine konnte gefolgert werden, daß drei Proteine (S11, S18 und S21) Bestandteile des Komplexes sind. Obwohl Protein S12 durch PDM verändert wurde, war es nicht im Komplex vertreten.

Da das Proteinaggregat mehr als zwei Proteine enthält, besitzt das Ergebnis, wie bereits behandelt, keine Aussagekraft über die direkte Vernetzung der



Proteine untereinander. Die Identifizierungsmethode selbst ist zwar etwas umständlich, kann aber als sicher gelten, weil die tryptischen Peptide ein für jedes Protein typisches Merkmal sind.

#### Charakterisierung von gespaltenem Komplex

Sommer und Traut (1974) verwendeten MMBI (Tabelle 26b). Die Bestimmung der beiden Proteine im S18-S21-Komplex wurde mittels der als "g" bezeichneten Identifizierungsmethode durchgeführt (s. Tabelle 26a; s. auch S. 164).

#### c. Weitere Komplexe 30S-ribosomaler Proteine

Eine Übersicht über diese Komplexe wird in Tabelle 26c gegeben. Die Bestimmung der Proteinzusammensetzung fast aller Komplexe ist mit Hilfe einer der zuvor beschriebenen Nachweismethoden vollzogen worden. In mehreren Fällen führte die Verwendung verschiedener bifunktioneller Reagenzien zur Bildung der gleichen Aggregate.

Zur Charakterisierung der drei Komplexe S5-S9, S6-S7-S9 sowie S11- oder S12-S19 wurde von Traut und Mitarbeitern eine Methode angewendet, die bisher noch nicht erwähnt worden ist und in Tabelle 26c "Methode 1" genannt wird (Bickle et al., 1972). <sup>35</sup>S-markierte 30S Untereinheiten wurden mit DMSub behandelt, die gebildeten radioaktiven Aggregate mittels eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese isoliert und durch Ammoniak gespalten. Anschließend wurden die Spaltprodukte mit Hilfe eindimensionaler SDS- oder Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch bestimmt.

Die drei auf diese Weise ermittelten Komplexergebnisse sind als vorläufig einzustufen (s. auch Traut et al., 1974). Folgende Einschränkungen der Methode machen dies erforderlich: Vorversuche, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter entsprechenden Bedingungen durchgeführt wurden, ergaben, daß die Ausbeute an Spaltprodukten - wie auch von Bickle et al. beschrieben - nicht höher als 10% liegt und das Trennungsverhalten Ammoniak-behandelter Einzelproteine im Vergleich zu unbehandelten bei eindimensionaler Harnstoff-Gelelektrophorese verändert sein kann. Außerdem ist die autoradiographische Bestimmung der Spaltprodukte nur unter Vorbehalt zulänglich; eine relativ scharfe Separation zweier benachbart wandernder Komponenten, wie sie etwa bei den bereits behandelten vergleichbaren Methoden durch Radioaktivitätsmessung einzelner Gelstücke im Scintillationszähler zu zeigen ist, läßt sich lediglich bedingt nachweisen. Das kann besonders dann zu falschen Schlüssen führen, wenn bei dem wenigen Material der gespaltenen Komplexe

selbst nur geringe Mengen unvernetzter Proteine als Verunreinigung vorliegen, die bei der Aggregatisolierung nicht abzutrennen sind.

Zum Vergleich sei noch einmal auf die ebenfalls eingeschränkte "Methode d" verwiesen (s. S. 162), bei der auch Imidoester durch Ammoniak gespalten werden (Clegg und Hayes, 1974; Barritault et al., 1975; Barritault und Expert-Bezançon, 1975). Hierbei waren aber die Hydrolysebedingungen so gewählt, daß 70% Ausbeute an Spaltprodukten erzielt wurden und keine Veränderungen im Trennungsverhalten der Proteine auftraten. Weiterhin wurde zur Proteinseparation statt eindimensionaler Gelelektrophorese die trennschärfere zweidimensionale Technik angewendet.

#### d. Komplexe 50S-ribosomaler Proteine

Bisher wurden bereits mehr als 15 Komplexe aus der 50S Untereinheit nachgewiesen (Tabelle 26d). Ausschließlich Lysin-spezifische Reagenzien sind dabei getestet worden. Nahezu alle Ergebnisse müssen noch unter gewissen Vorbehalten gesehen werden. Das ist vor allem deshalb notwendig, weil fast durchweg die "Identifizierungsmethode d" angewendet wurde, die - wie schon gesagt - in ihrer Aussagekraft eingeschränkt sein kann.

#### e. Der Komplex S16-LX

Sun et al. (1974b) ermittelten einen Komplex, der sich aus einem Protein der 30S Untereinheit und wenigstens einem der 50S Subpartikel zusammensetzt. Undissoziierte 70S Ribosomen, deren 50S-Proteine <sup>35</sup>S-markiert und 30S-Proteine unmarkiert waren, wurden mit Glutaraldehyd behandelt; das anschließend extrahierte Gesamtproteingemisch wurde ohne jede Fraktionierung in Radioimmuno-Doppeldiffusionstesten mit Antiseren gegen 30S-Einzelproteine inkubiert ("Methode m" in Tabelle 26e). Anti-S16 bildete als einziges Serum eine radioaktive Präzipitationslinie. Daraus folgerte man, daß das unmarkierte Protein S16 mit mindestens einem bisher noch nicht identifizierten markierten 50S-Protein in einem Komplex vorliegt. Dieses Ergebnis, das eine Nachbarschaft zwischen Proteinen der 30S und 50S Untereinheiten widerspiegelt, ließ den Schluß zu, daß S16 in 70S Ribosomen nahe dem Untereinheiten-Grenzbereich orientiert ist.

"Methode m" ist eine sichere Identifizierungstechnik. Da Komplexe untersucht werden, in denen eins der Proteine radioaktiv ist, liegt den Immuno-Diffusionstesten ein vergleichbares Prinzip zugrunde wie der in Abschnitt II.2.2.2.2. vorgestellten Technik, bei der die Antigen-Antikörper-Komplexe über Molekularsiebsäulen aufgetrennt werden (s. auch "Methode a"): In beiden

Fällen erbringen die Antikörper gegen ein unmarkiertes Protein den Nachweis eines Proteinaggregats, wenn radioaktive Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet werden.

#### f. Vernetzungen zwischen Initiations- bzw. Elongationsfaktoren und ribosomalen Proteinen

Radioaktiv markierter Initiationsfaktor IF2 oder IF3 wurde an unmarkierte 30S Untereinheiten gebunden. Die Anlagerung von  $^{32}\text{P}$ -IF2 geschah in Gegenwart der unmarkierten Faktoren IF1 und IF3, die Bindung von  $^{14}\text{C}$ -IF3 in Abwesenheit der übrigen Initiationsfaktoren; die Vernetzungsreagenzien waren PDM oder DMSub (Tabelle 26f) (Bollen et al., 1975; Hawley et al., 1975; s. auch Traut et al., 1974). In fast allen Fällen wurden die einzelnen Faktoren mit mehreren 30S-Proteinen in Komplexen nachgewiesen (Tabelle 26f). Es ist zwar anzunehmen, daß die verknüpfbaren ribosomalen Proteine in der Nähe der jeweiligen Faktorenbindungsstelle vorliegen, jedoch kann - wie bei allen Aggregaten mit mehr als zwei Proteinen - nichts über die direkte Vernetzung zwischen dem Faktor und den Proteinen ausgesagt werden. Da für einige der Resultate noch nicht die Primärliteratur vorliegt, lassen sich mögliche experimentelle Ursachen für die teilweise unterschiedliche Proteinkomposition der Komplexe nicht diskutieren.

Acharya et al. (1973) zeigten, daß u.a. die Proteine L7/L12 mit dem Elongationsfaktor EF-G zu vernetzen sind. Die Autoren wendeten eine sichere Identifizierungstechnik an ("Methode n"), die im wesentlichen "Methode j" entspricht (s. Tabelle 26b u. f; s. auch S. 166). Sie rekonstituierten 50S Untereinheiten, die  $^3\text{H}$ -markierte Proteine L7/L12 enthielten, und banden  $^{35}\text{S}$ -markierten EF-G an diese Untereinheiten. Nach Vernetzung mit Difluordinitrobenzol (6Å Abstand zwischen den beiden reaktiven Gruppen) wurde der Proteinanteil der Subpartikel extrahiert und ein doppelmarkierter EF-G-L7/L12-Komplex säulenchromatographisch isoliert. Das Verhältnis  $^3\text{H}:^{35}\text{S}$  im Komplex ließ auf eine Stöchiometrie von 2-2,5 Kopien L7/L12 pro Molekül EF-G schließen. Da das Molekulargewicht des Komplexes wesentlich höher lag als das summierte Molekulargewicht der ermittelten Anteile an L7/L12 und EF-G, ist zu folgern, daß das Aggregat weitere unmarkierte 50S-Proteine enthält.

#### g. Zusammenfassung

Von allen untersuchten Proteinnachbarschaften sind die zwischen S5 und S8

einerseits sowie S13 und S19 andererseits am besten abgesichert, weil für beide Proteinpaare der Nachbarschaftsnachweis auch für funktionstüchtige Ribosomen erbracht werden konnte (Lutter und Kurland, 1973; Lutter, 1973) (s. "Methode b", S. 161 und Tabelle 26a u. c). Ferner wurde nur noch für S7-S9 berichtet, daß eine Rekonstitution in intakte Untereinheiten versucht wurde (Lutter, 1973). Dieses Proteinpaar ließ sich jedoch nicht einbauen und führte folglich nicht zur Bildung aktiver Subpartikel.

Zeigt ein derartiges Ergebnis notwendigerweise, daß die vernetzten Proteine in intakten Ribosomen nicht benachbart vorkommen? Das ist aus folgenden Gründen zu verneinen: Schon die Modifikation einer bestimmten Aminosäure in einem der komplexierten Proteine durch das Vernetzungsreagens könnte die Wechselwirkung mit anderen Proteinen bei der Rekonstitution hemmen und dadurch den Einbau des Komplexes verhindern (s. z.B. Kahan et al., 1974). Es wäre aber auch möglich, daß ein Komplex zwar eingebaut werden kann, daß jedoch eine Aminosäure, die für eine ribosomale Teilfunktion zuständig ist, durch die Verknüpfung blockiert wird und somit die Ribosomen inaktiv sind. Das sollte beispielsweise für das durch PDM vernetzte Proteinpaar S18-S21 zu erwarten sein; für S18 ist bekannt, daß die Modifikation seines Cysteins zur Inhibition der tRNS-Bindung in die ribosomale "p-site" führt (Moore, 1971; Ginzburg et al., 1973). Verallgemeinernd dürfte also durchaus angenommen werden, daß Komplexe, die unter annähernd gleichen Bedingungen wie S5-S8 und S13-S19 gebildet werden, Nachbarschaften im strukturell und funktionell intakten Ribosom wiedergeben.

Um Aussagen über sichere Proteinnachbarschaften treffen zu können, bedarf es weiterhin einer eindeutigen Charakterisierung der Komplexe. Einzig und allein für Proteinpaare, in denen im Gegensatz zu größeren Aggregaten die direkte Verknüpfung zwischen den Proteinen offenkundig ist, wird diese Voraussetzung erfüllt, wenn sie mit wenigstens einer zuverlässigen Methode identifiziert und/oder bei mehreren Untersuchungen gefunden wurden.

Bislang können unter diesen Gesichtspunkten 19 Komplexe aus der 30S Untereinheit als abgesichert klassifiziert werden (Tabelle 26a-c). Da diese Paare zum Teil überlappende Proteinkompositionen aufweisen, ließ sich ein Schema aufstellen, das die Vernetzbarkeit mehrerer 30S-Proteine untereinander verdeutlicht (Abb. 21a). Aggregate mit mehr als zwei Proteinen und fragliche Komplexe, in denen eins der Proteine nicht eindeutig bestimmt ist, blieben dabei unberücksichtigt.

Vergleichbar strenge Kriterien können noch nicht bei der Beurteilung von

Komplexen aus 50S-Proteinen zugrunde gelegt werden. Wie bereits erwähnt, ist zur Aufklärung von Proteinnachbarschaften in der 50S Subpartikel bisher hauptsächlich eine nur bedingt zuverlässige Identifizierungsmethode angewendet worden. Da somit in fast allen Fällen noch keine Aussagen über abgesicherte Komplexe zu machen sind, konnten die in Tabelle 26d aufgeführten Komplexe lediglich in einem vorläufigen Vernetzungsschema zusammengefaßt werden (Abb.21b). Hierbei sind neben Proteinpaaaren auch größere Aggregate einbezogen worden.

In Zukunft sollten für die Ermittlung von Komplexen 30S- und 50S-ribosomaler Proteine unterschiedliche Strategien gewählt werden: Bei den Untersuchungen mit 50S Untereinheiten bedarf es vor allem sicherer Nachweismethoden und neuer bifunktionaler Reagenzien, die mit anderen Aminosäuren als Lysin reagieren. Wie Slobin (1972) zeigen konnte, sind Lysin-spezifische Reagenzien zur Vernetzung der 50S Untereinheit nicht sonderlich gut geeignet; in dieser Untereinheit sind im Verhältnis nur etwa halb so viele Lysine reaktiv wie in der 30S Subpartikel.

Um für die vergleichsweise schon ausführlich untersuchte 30S Untereinheit ein noch umfassenderes Bild über Proteinnachbarschaften zu gewinnen, sollte systematisch ermittelt werden, welches bestimmte Protein mit welchen anderen zu verknüpfen ist. Hierbei dagegen würden sich z.B. die Lysin-spezifischen Imidoester als Reagenzien wieder anbieten. Eine gut geeignete Charakterisierungsmethode für eine derartige systematische Analyse wäre die in Abschnitt II.2.2.2.2. dieser Arbeit vorgestellte immunologische Technik (s. auch "Methode a" in Tabelle 26a). Für diese Studien müßten dann 30S Untereinheiten rekonstituiert werden, die ein radioaktiv markiertes Protein und sonst unmarkierte Proteine enthalten. Sämtliche Untersuchungen sollten im übrigen fortan mit Subpartikeln durchgeführt werden, die nach Zamir et al. (1974) aktiviert worden sind. Dadurch ließen sich etwaige Reaktivitätsabweichungen der Proteine ausschließen, die auf Konformationsunterschieden der Untereinheiten beruhen könnten (s. auch Abschnitt I.3.4.b).



Tabelle 26. Proteinmacharschaften im Ribosom - Vernetzungsexperimente mit bifunktionellen Reagenzien

| Vernetzte Proteine | Reagens                            | Identifizierungsmethode                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Referenz                             |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| a. <u>S5-S8</u>    | Dimethyl-adipimidat (DMA) (9Å)     | <p>Methode a:</p> <p>1D-gelelektrophoretische Analyse von ungespaltenem Komplex, in dem eins der Proteine radioaktiv markiert ist</p> <p>Immunologische Identifizierung: Immuno-Doppeldiffusion mit isoliertem, ungespaltenem und unmarkiertem Komplex; Inkubation von radioaktiv markiertem, ungespaltenem Komplex mit Antikörpern, Fraktionierung der Komplex-Antikörper-Aggregate über Molekularsiebsäulen</p> | diese Arbeit;<br>Lutter et al., 1972 |
|                    | DMA (9Å)                           | <p>Methode b:</p> <p>Rekonstitution des Komplexes in funktionstüchtige 30S Untereinheiten</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Lutter und Kurland, 1973             |
|                    | Dimethyl-suberimidat (DMSub) (12Å) | <p>Methode a</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Bode et al., 1974                    |
|                    | DMSub (12Å)                        | <p>Methode c:</p> <p>Isolierung des Komplexes, in dem beide Proteine radioaktiv markiert sind</p> <p>Immunologische Identifizierung des ungespaltenen Komplexes mittels Radioimmuno-Doppeldiffusion</p>                                                                                                                                                                                                           | Sun et al., 1974a                    |



## Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine | Reagens                                          | Identifizierungsmethode                                                                                                                                                                                                                                     | Referenz                                                                                |
|--------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| noch:<br>SS-S8     |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                         |
|                    | Dimethylsuccinimidat (DMSuc) (6Å)                | Methode d:<br>Isolierung des Komplexes, in dem beide Proteine radioaktiv markiert sind                                                                                                                                                                      | Clegg und Hayes, 1974;<br>Barritault et al., 1975; Barritault und Expert-Bezançon, 1975 |
|                    | DMA (9Å)<br>DMSub (12Å)                          | Spaltung des Komplexes durch Ammoniak<br>2D-gelelektrophoretische Identifizierung der Einzelproteine<br>Übereinstimmung des MG des Komplexes mit der Summe der MG der Einzelproteine                                                                        |                                                                                         |
|                    | Tartryldiazid (TDA) (6Å)                         | Methode e:<br>Isolierung des Komplexes, in dem beide Proteine unmarkiert sind                                                                                                                                                                               | Lutter et al., 1974b                                                                    |
|                    | Tartryldi-(glycylhydrazid) (TDGA) (13Å)          | Spaltung des Komplexes mit Perjodat<br>2D-SDS-gelelektrophoretische Identifizierung der Einzelproteine<br>Immunologische Identifizierung der Komplexfraction mittels Immunodoppeldiffusion                                                                  |                                                                                         |
|                    | Tartryldi-(ε-amino-caproylhydrazid) (TDGA) (23Å) |                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                         |
|                    | Methyl 4-Mercapto-butyrimidat (NMBI) (17Å)       | Methode f:<br>Isolierung des Komplexes, in dem beide Proteine radioaktiv markiert sind<br>Reduktive Spaltung des Komplexes<br>1D-SDS-gelelektrophoretische Identifizierung der Einzelproteine<br>Immunologische Identifizierung der Komplexfraction mittels | Sun et al., 1974a                                                                       |

Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine                | Reagens                                       | Identifizierungsmethode                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Referenz                                                      |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| noch:<br>S5-S8                    |                                               | Radioimmuno-Doppeldiffusion<br>Übereinstimmung des MG des Komplexes mit der Summe der MG der Einzelproteine                                                                                                                                                                                                                         |                                                               |
|                                   | MMBI (17Å)                                    | Methode g:<br>2D-SDS-gelelektrophoretische Separation der Proteine behandelte Untereinheiten<br>Reduktive Spaltung des Komplexes, in dem beide Proteine radioaktiv markiert sind<br>2D-gelelektrophoretische Identifizierung der Reduktionsprodukte<br>Übereinstimmung des MG des Komplexes mit der Summe der MG der Einzelproteine | Sommer und Traut, 1974, 1975                                  |
| S5-S8-S15<br>od. -S16<br>od. -S17 | DMSub (12Å)                                   | Methode d                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Barritault et al., 1975; Barritault und Expert-Bezançon, 1975 |
| S4-S5-S8                          | DWA (9Å)<br>DMSub (12Å)                       | Methode d                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Barritault et al., 1975; Barritault und Expert-Bezançon, 1975 |
| b. S18-S21                        | N,N'-p-Phenyl-<br>dimaleinimid<br>(PDM) (12Å) | Methode h:<br>Isolierung des Komplexes, in dem beide Proteine un-markiert sind<br>Immunologische Identifizierung des ungespaltenen Komplexes mittels Immuno-Doppeldiffusion                                                                                                                                                         | diese Arbeit;<br>Lutter et al., 1972                          |

## Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine | Reagens                               | Identifizierungsmethode                                                                                                                                                                       | Referenz                                                                                                                  |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| noch:<br>S18-S21   | PDM (12Å)                             | Methode i:<br>Gemeinsame Verminderung der Proteintrennungsbanden von S18 und S21 bei 1D-Gelelektrophorese<br>Auftreten eines Komplexes, dessen MG der Summe der MG von S18 und S21 entspricht | Chang und Flaks, 1972                                                                                                     |
|                    | PDM (12Å)                             | Methode j:<br>Rekonstitution von 30S Untereinheiten mit $^{14}\text{C}$ -S18 und $^3\text{H}$ -S21<br>Separation eines doppelmarkierten Komplexes durch 1D-Gelelektrophorese                  | Kurland et al., 1972b                                                                                                     |
| S11-S18-S21        | MMEI (17Å)<br>Tetranitromethan        | Methode g<br>Methode k:<br>Peptidanalyse von isoliertem, ungespaltenem Komplex                                                                                                                | Sommer und Traut, 1974<br>Shih und Craven, 1973                                                                           |
| c. S1-S12          | PDM (12Å)                             | ?                                                                                                                                                                                             | Bollen, präsentiert anlässlich des "Ribosome Workshop" in Göteborg/Schweden, 1974<br>Barritault und Expert-Bezançon, 1975 |
| S2-S3              | DMSuc (6Å)<br>DMA (9Å)<br>DMSub (12Å) | Methode d                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                           |

Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine | Reagens                               | Identifizierungsmethode                         | Referenz                                                                                           |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| noch:<br>S2-S3     | TDA (6Å)<br>TDGA (13Å)<br>TDCA (23Å)  | Methode e                                       | Lutter et al., 1974b                                                                               |
|                    | MMBI (17Å)                            | Methode f (ohne immunologische Identifizierung) | Sun et al., 1974a                                                                                  |
|                    | MMBI (17Å)                            | Methode g                                       | Sommer und Traut, 1974, 1975                                                                       |
| <u>S2-S5</u>       | TDA (6Å)<br>TDGA (13Å)<br>TDCA (23Å)  | Methode e                                       | Lutter et al., 1974b                                                                               |
| <u>S2-S8</u>       | TDA (6Å)<br>TDGA (13Å)<br>TDCA (23Å)  | Methode e                                       | Lutter et al., 1974b                                                                               |
| <u>S3-S4</u>       | MMBI (17Å)                            | Modifizierte Methode g                          | zitiert in Sommer und Traut, 1975                                                                  |
| <u>S3-S10</u>      | TDA (6Å)<br>TDGA (13Å)<br>TDCA (23Å)  | Methode e                                       | Lutter et al., 1974b                                                                               |
| <u>S4-S5</u>       | MMBI (17Å)<br>DMA (9Å)<br>DMSub (12Å) | Modifizierte Methode g<br>Methode d             | zitiert in Sommer und Traut, 1975<br>Barritault et al., 1975; Barritault und Expert-Bezançon, 1975 |

Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine | Reagens                              | Identifizierungsmethode                                                                                                                                                                        | Referenz                                     |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| noch:<br>S4-S5     | TDA (6Å)<br>TDGA (13Å)<br>TDCA (23Å) | Methode e                                                                                                                                                                                      | Lutter et al., 1974b                         |
| S4-S6              | MBI (17Å)                            | Methode g                                                                                                                                                                                      | Sommer und Traut, 1975                       |
| S4-S8              | MBI (17Å)                            | Methode g                                                                                                                                                                                      | Sommer und Traut, 1975                       |
| S4-S9              | MBI (17Å)                            | Methode g                                                                                                                                                                                      | Sommer und Traut, 1975                       |
| S4-S12             | MBI (17Å)                            | Methode g                                                                                                                                                                                      | Sommer und Traut, 1975                       |
| S4-S13             | MBI (17Å)                            | Methode g                                                                                                                                                                                      | Sommer und Traut, 1974                       |
| S5-S9              | DMSub (12Å)                          | Methode l:<br>Isolierung des Komplexes, in dem beide Proteine radioaktiv markiert sind<br>Spaltung des Komplexes durch Ammoniak<br>1D-gelelektrophoretische Identifizierung der Einzelproteine | Bickle et al., 1972                          |
| S6-S7-S9           | MBI (17Å)                            | Methode g                                                                                                                                                                                      | Sommer und Traut, 1974, 1975                 |
| S6-S14-S18         | DMSub (12Å)<br>DMSub (12Å)           | Methode l<br>Methode d                                                                                                                                                                         | Bickle et al., 1972<br>Clegg und Hayes, 1974 |

## Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine | Reagens             | Identifizierungsmethode          | Referenz                                                             |
|--------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <u>S6-S18</u>      | DMA<br>DMSub        | (9Å)<br>(12Å) Methode d          | Clegg und Hayes, 1974;<br>Barritault und Expert-<br>Bezançon, 1975   |
|                    | TDA<br>TDGA<br>TDCA | (6Å)<br>(13Å)<br>(23Å) Methode e | Lutter et al., 1974b                                                 |
|                    | MMBI                | (17Å) Modifizierte Methode g     | zitiert in Sommer und<br>Traut, 1975                                 |
|                    | DMA<br>DMSub        | (9Å)<br>(12Å) Methode d          | Barritault und Expert-<br>Bezançon, 1975                             |
|                    | MMBI                | (17Å) Methode g                  | Sommer und Traut, 1975                                               |
| <u>S7-S8</u>       | DMA<br>DMSub        | (9Å)<br>(12Å) Methode a          | Lutter et al., 1974a;<br>Bode et al., 1974                           |
|                    | DMSub               | (12Å) Methode d                  | Barritault et al., 1975                                              |
|                    | TDA<br>TDGA<br>TDCA | (6Å)<br>(13Å)<br>(23Å) Methode e | Lutter et al., 1974b                                                 |
|                    | MMBI                | (17Å) Methode g                  | Sommer und Traut, 1974,<br>1975                                      |
|                    | DMSub               | (12Å) Methode d                  | Barritault et al., 1975;<br>Barritault und Expert-<br>Bezançon, 1975 |
| <u>S7-S13-S19</u>  |                     |                                  |                                                                      |



| Vernetzte Proteine | Reagens               | Identifizierungsmethode                                                                 | Referenz                                                       |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| S8-S15             | DMSub                 | (12Å) Methode d                                                                         | Barritault und Expert-Bezançon, 1975                           |
| S8-S15 od. -S16    | DMSub                 | (12Å) Methode d                                                                         | Barritault et al., 1975                                        |
| S8-S16 od. -S17    | DMSub                 | (12Å) Methode d                                                                         | Barritault und Expert-Bezançon, 1975                           |
| S11- od. S12-S19   | DMSub                 | (12Å) Methode I                                                                         | Bickle et al., 1972                                            |
| S13-S14-S19        | DMSub                 | (12Å) Methode d                                                                         | Barritault und Expert-Bezançon, 1975                           |
| <u>S13-S19</u>     | DMA<br>DMSub          | (9Å)<br>(12Å) Methode a                                                                 | Lutter et al., 1974a;<br>Bode et al., 1974                     |
|                    | DMA                   | (9Å) Methode b:<br>Rekonstitution des Komplexes in funktionstüchtige 30S Untereinheiten | Lutter, 1973                                                   |
|                    | DMSuc<br>DMA<br>DMSub | (6Å)<br>(9Å)<br>(12Å) Methode d                                                         | Clegg und Hayes, 1974;<br>Barritault und Expert-Bezançon, 1975 |
|                    | TDA<br>TDGA<br>TDCA   | (6Å)<br>(13Å)<br>(23Å) Methode e                                                        | Lutter et al., 1974b                                           |
|                    | MMBI                  | (17Å) Methode f                                                                         | Sum et al., 1974a                                              |

Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine | Reagens     | Identifizierungsmethode | Referenz                             |
|--------------------|-------------|-------------------------|--------------------------------------|
| noch:<br>S13-S19   | MtBI (17Å)  | Methode g               | Sommer und Traut, 1974               |
| S14-S19            | DMSub (12Å) | Methode a               | Bode et al., 1974                    |
| d. L2-L7/L12       | MtBI (17Å)  | Methode g               | zitiert in Traut et al., 1974        |
| L2-L9              | DMSub (12Å) | Methode d               | Expert-Bezançon und Barritault, 1975 |
| L2-L13-L20         | DMSub (12Å) | Methode d               | Barritault, pers. Mitteilung         |
| L2-L29             | DMSub (12Å) | Methode d               | Barritault, pers. Mitteilung         |
| L5-L7/L12          | MtBI (17Å)  | Methode g               | zitiert in Traut et al., 1974        |
| L5-L10-L11-L13     | DMSub (12Å) | Methode d               | Clegg und Hayes, 1974                |
| L7/L12-L10         | DMSub (12Å) | Methode d               | Expert-Bezançon und Barritault, 1975 |
| L7/L12-L11         | DMSub (12Å) | Methode d               | Expert-Bezançon und Barritault, 1975 |
| L8-L10 od. -L11    | DMSub (12Å) | Methode d               | Clegg und Hayes, 1974                |

| Vernetzte Proteine | Reagens       | Identifizierungsmethode                                                                                                        | Referenz                             |
|--------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| L9-L10-L11         | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Clegg und Hayes, 1974                |
| L10-L11            | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Barritault, pers. Mitteilung         |
| L13-L14            | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Barritault, pers. Mitteilung         |
| L14-L17            | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Barritault, pers. Mitteilung         |
| L17-L19            | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Barritault, pers. Mitteilung         |
| L17-L23            | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Barritault, pers. Mitteilung         |
| L17-L32            | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Expert-Bezançon und Barritault, 1975 |
| L17-L32 od. L33    | MABI (17Å)    | Methode g                                                                                                                      | zitiert in Traut et al., 1974        |
| L20-L27-L31-L33    | DMSub (12Å)   | Methode d                                                                                                                      | Barritault, pers. Mitteilung         |
| e. S16-LX          | Glutaraldehyd | Methode m:<br>Immunologische Identifizierung des ungespaltenen, unfraktionierten Komplexes mittels Radioimmuno-Doppeldiffusion | Sun et al., 1974b                    |

Fortsetzung: Tabelle 26

| Vernetzte Proteine                        | Reagens                    | Identifizierungsmethode                                                                                                                                                    | Referenz                       |
|-------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| noch:<br>S16-LX                           |                            | (Vernetzung von 70S Ribosomen, wobei 50S im Proteinanteil radioaktiv markiert und 30S unmarkiert sind)                                                                     |                                |
| f. IF2-S1, S2, S11, S12, S13, S14, S19    | DMSub (12Å)                | Methode m<br>(IF2 ist radioaktiv markiert)                                                                                                                                 | Bollen et al., 1975            |
| IF2-S1, S11, S13, S19                     | DMSub (12Å)                | Methode m<br>(IF2 ist radioaktiv markiert)                                                                                                                                 | zitiert in Traut et al., 1974  |
| IF3-S12                                   | DMSub (12Å)                | Methode m<br>(IF3 ist radioaktiv markiert)                                                                                                                                 | Hawley et al., 1974            |
| IF3-S1, S11, S12, S13, S14                | PDM (12Å)                  | Methode m<br>(IF3 ist radioaktiv markiert)                                                                                                                                 | zitiert in Traut et al., 1974  |
| IF3-S1, S11, S12, S13, S14, S18, S19, S21 | DMSub (12Å)                | Methode m<br>(IF3 ist radioaktiv markiert)                                                                                                                                 | zitiert in Bollen et al., 1975 |
| EF-G-L7/L12                               | Difluor-dinitrobenzol (6Å) | Methode n:<br>Rekonstitution von 50S Untereinheiten mit $^3\text{H}$ -L7/L12; Bindung von 35S-EF-G<br>Säulenchromatographische Separation eines doppelmarkierten Komplexes | Acharya et al., 1973           |

Legende zu Tabelle 26:

- a. S5-S8-Komplex
- b. S18-S21-Komplex
- c. Weitere Komplexe 30S-ribosomaler Proteine
- d. Komplexe 50S-ribosomaler Proteine
- e. S16-LX-Komplex
- f. Komplexe, die aus einem Initiations- bzw. Elongationsfaktor und ribosomalen Proteinen bestehen

Die in Tabelle 26a-c unterstrichenen Proteinpaaare können als gut abgesichert gewertet werden:

— mittels wenigstens einer zuverlässigen Identifizierungsmethode und/oder bei mehreren Untersuchungen nachgewiesen;

== zusätzlich erfolgreich in funktionstüchtige Untereinheiten zu rekonstituieren.

Aggregate mit mehr als zwei Proteinen geben lediglich die Zusammensetzung, nicht aber die direkte Vernetzung der Proteine untereinander wieder. Komplexe, in denen eins der Proteine nicht eindeutig charakterisiert ist, sind als vorläufig anzusehen. Für Einzelheiten s. Text.

MG = Molekulargewicht(e)

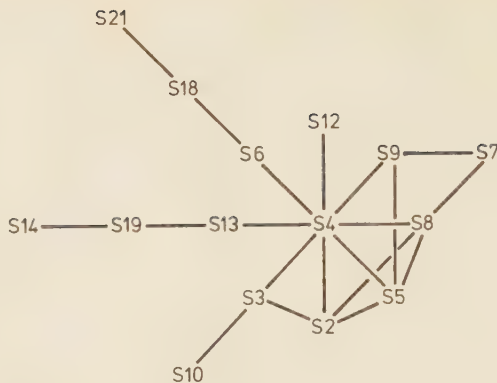


Abb. 21 a. Zusammenfassung der Vernetzbarkeit mehrerer 30S-ribosomaler Proteine

Es sind nur die als abgesichert gewerteten Proteinpaare berücksichtigt (unterstrichene Komplexe in Tabelle 26a-c).

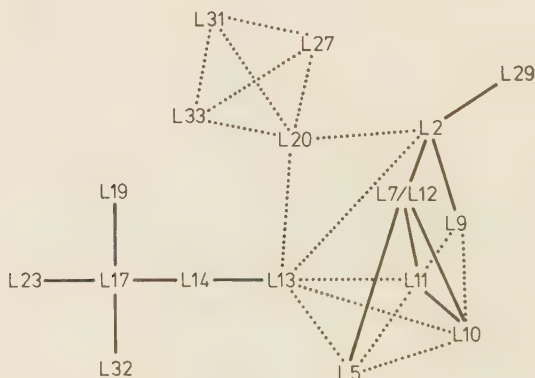


Abb. 21 b. Vorläufige Zusammenfassung der Vernetzbarkeit mehrerer 50S-ribosomaler Proteine

Es sind Proteinpaare (—) und größere Aggregate (.....) einbezogen (s. Tabelle 26d). Komplexe, in denen eins der Proteine nicht eindeutig charakterisiert ist, bleiben unberücksichtigt. Weiteres s. im Text.



### III. Immunelektronenmikroskopische Lokalisation ribosomaler Proteine auf der Ribosomenoberfläche

#### III.1. Einleitung

Immunelektronenmikroskopische Experimente, bei denen Antigen-Antikörper-Komplexe elektronenoptisch untersucht werden, wurden erstmals zum Sichtbarmachen antigener Proteine in makromolekularen Verbänden wie z.B. Viren angewendet (Anderson und Stanley, 1941; Anderson et al., 1961; Lafferty und Oertlis, 1961). Mit Einführung der Negativ-Kontrastierungsmethode ("Negative Staining") (Brenner und Horne, 1959) und durch die Verbesserung des Auflösungsvermögens der Elektronenmikroskope konnten schließlich die Ansatzpunkte von Antikörpern an Viruspartikeln bestimmt und damit die antigenen Virusproteine in situ lokalisiert werden.

Die Ortsbestimmung eines Antigens setzt voraus, daß der Molekülverband klare topographische Orientierungspunkte aufweist. Diese Bedingung ist nicht immer bei Viren, wohl aber bei den hier untersuchten Subpartikeln des E. coli-Ribosoms gegeben. Elektronenoptische Versuche zeigten, daß 30S und 50S Untereinheiten an ihren Oberflächen jeweils deutliche Strukturmerkmale besitzen (Huxley und Zubay, 1960; Hart, 1962; Lubin, 1968; Amelunxen, 1971; Wabl et al., 1973a, b; s. auch den folgenden Abschnitt III.2.1.).

Die Tatsache, daß jedes ribosomale Protein mit wenigstens einer antigenen Determinante an der Oberfläche seiner entsprechenden Ribosomen-Untereinheit zur Antikörperbindung zugänglich ist, wurde ausgenutzt, um die räumliche Anordnung der Proteine im Ribosom zu bestimmen: 30S oder 50S Subpartikel wurden analog zu den in Ergebnisteil I. beschriebenen Bedingungen mit Antikörpern gegen ribosomale Einzelproteine inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden mittels Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Fraktionen mit Dimeren (30S-Antikörper-30S- bzw. 50S-Antikörper-50S-Komplexen) anschließend zum Sichtbarmachen der jeweiligen Antikörperbindungsstelle auf der Ribosomenoberfläche elektronenoptisch untersucht. Die Antikörperbindungs-orte, welche die Positionen der antigenen Proteine auf der Partikeloberfläche wiedergeben, ließen sich aufgrund der Strukturiertheit des Ribosoms typischen strukturellen Merkmalen der Untereinheiten zuordnen. Mit Hilfe solcher Experimente wurden bereits zwei 50S-Proteine auf der Ribosomenoberfläche lokalisiert (Wabl, 1973, 1974).

In der vorliegenden Arbeit werden die Positionen der Proteine S5, S13 und S14 sowie der Proteine L14, L17, L18, L19, L22 und L23 auf der Oberfläche der 30S bzw. 50S Untereinheit beschrieben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind bereits veröffentlicht (Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a, b).

### III.2. Ergebnisse

#### III.2.1. Die Form der 30S- und 50S-ribosomalen Untereinheiten

##### III.2.1.1. Die 30S Untereinheit

Isolierte 30S Untereinheiten wurden, wie in "Materialien und Methoden" beschrieben, hitzeaktiviert und durch Rohrzuckergradienten zentrifugiert (s. Abb. 3). Die 30S-Gipfelfraktion wurde direkt für die elektronenoptische Untersuchung als Kontrolle benutzt. Ein Übersichtsbild mit negativ-kontrastierten 30S Partikeln, die bei 1 mM  $Mg^{++}$  inkubiert waren, wird in Abbildung 22 gezeigt. Die Mehrzahl aller 30S Untereinheiten war gleichmäßig verteilt. Nur wenige waren degradiert oder traten in Aggregaten auf. Wie schon bei geringer Vergrößerung zu ersehen ist, haben alle 30S Untereinheiten ähnliche Formen. Sie besitzen eine längliche, asymmetrische Gestalt, die aus zwei verschieden proportionierten globulären Teilen besteht. Der kleinere globuläre Teil gleicht dabei einem "Kopf", der durch einen "Hals" vom größeren Teil, dem "Körper", abgetrennt ist. Die Partikel haben ein Achsenverhältnis von etwa 2:1 und Dimensionen von ca.  $180-200\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 80\text{\AA}$ . Entsprechende Maße wurden für Untereinheiten in 30S-IgG-30S-Komplexen ermittelt, wobei unter anderem die Fab-Arme der IgG-Antikörper mit Dimensionen von  $70-80\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 40\text{\AA}$  (Sarma et al., 1971; Poljak et al., 1973) als Maßstab dienten.

30S Untereinheiten, die bei 0,3 bzw. 20 mM  $Mg^{++}$  inkubiert waren, weisen gleiche Formenmerkmale auf (nicht dargestellt).

Folgende unterscheidbare Partikelformen ließen sich in vergrößerten Ansichten erkennen (Abb. 23): Einige Partikel haben eine Grube zwischen "Kopf" und "Körper" (Abb. 23/Spalte 5); andere weisen eine relativ kompakte, dreieckige Form auf (Abb. 23/Spalten 1 u. 2). Eine weitere Partikelprojektion besitzt am größeren globulären Abschnitt Ausstülpungen, die lappenförmig abstehen (Abb. 23/Spalten 3 u. 4). Bildlich gesprochen, gleicht die 30S Untereinheit einem Embryo oder einem Telefonhörer. Ähnliche Formen wurden bereits in der

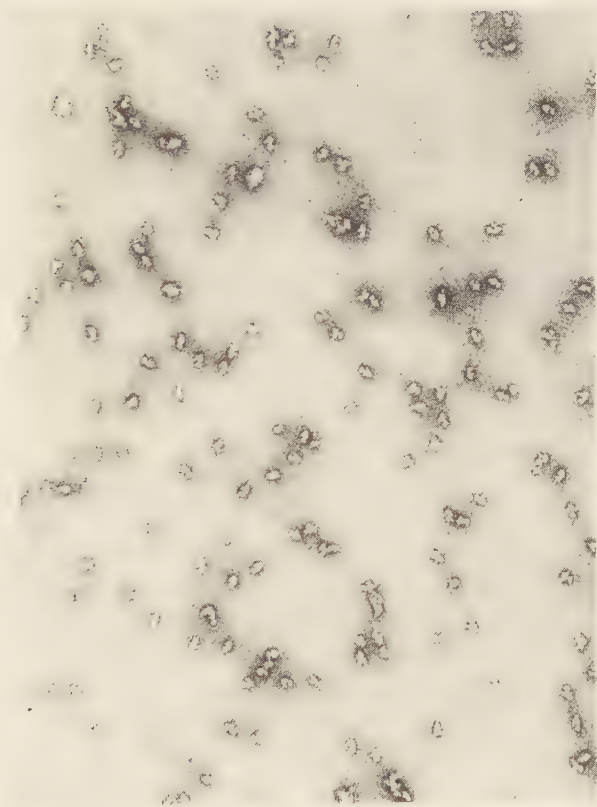


Abb. 22. Übersicht negativ-kontrastierter 30S Untereinheiten  
(X 120000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b)

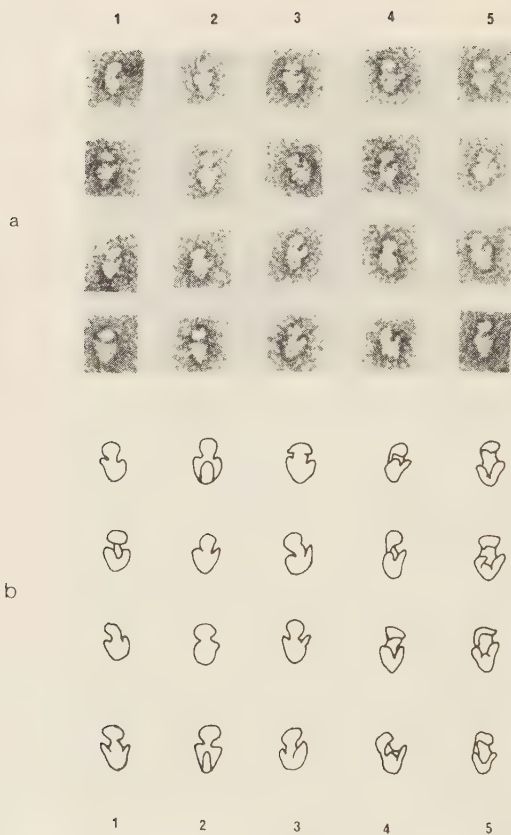


Abb. 23. Ausgewählte Ansichten von 30S Untereinheiten (a) und interpretierende Darstellungen (b)

(X 300000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b)

Literatur beschrieben (s. Abschnitt III.3.1.).

Die verschiedenen Subpartikelformen kommen in etwa gleichem Verhältnis vor. Sie dürften unterschiedliche Ansichten ein und derselben Struktur sein, deren Projektionen durch Rotation um ihre Längsachse ineinander überführbar sind. Die Partikelformen in Abbildung 23 sind so arrangiert, daß die Untereinheiten in jeder horizontalen Reihe von links nach rechts um jeweils  $45^{\circ}$  im Uhrzeigersinn gedreht erscheinen (vertikale Spalte 1:  $0^{\circ}$ ; Spalte 2:  $45^{\circ}$ ; Spalte 3:  $90^{\circ}$ ; Spalte 4:  $135^{\circ}$ ; Spalte 5:  $180^{\circ}$ ). Die folgenden immunoelektronenmikroskopischen Ergebnisse bestätigten diese Interpretation (s. Abb. 30 u. 31).

Die in Abbildung 23/Spalte 5 dargestellte Projektion wurde als Frontansicht bezeichnet. Zur Vereinfachung von Ortsangaben auf der 30S Untereinheit sind im Folgenden an Hand dieser Form Rechts-Links-Orientierungen vorgenommen worden (jeweils von der Partikel aus gesehen). Die Bezeichnung der rechten und linken Seite der 30S Untereinheit ist in Abbildung 32a verdeutlicht.

#### III.2.1.2. Die 50S Untereinheit

Wie die 30S Untereinheiten sind zunächst unbehandelte 50S Untereinheiten zur Kontrolle elektronenmikroskopisch untersucht worden. Isolierte 50S Subpartikel wurden einer Zentrifugation durch Rohrzuckergradienten unterzogen (s. Abb. 4) und nach Negativ-Kontrastierung im Elektronenmikroskop betrachtet. Die Mehrzahl der Untereinheiten war auf dem Kohlefilm gleichmäßig verteilt; lediglich einige Subpartikel aggregierten. In nur wenigen Fällen waren die Partikel degradiert (Abb. 24).

Zwei Hauptformen wurden beobachtet:

1. Ahornblattförmige Partikel mit drei Protuberanzen, die von der Oberkante eines runden Unterteils ausgehen; Untereinheiten in dieser Projektion wurden "Kronen-Formen" genannt.
2. Halbmondförmige Partikel mit einer asymmetrisch angeordneten Kerbe, die auf der ungleichmäßigen, konkaven Seite in der Nähe des sich verjüngenden Pols gelegen ist; diese Projektionen wurden als "Nieren-Formen" bezeichnet.

Jede der beiden Hauptformen, die in etwa gleichem Verhältnis vorkommen, tritt in zwei unterscheidbaren Ansichten auf. Als "Kronen" sind Front- und Rückenprojektionen beobachtet worden (Abb. 25a u. b), wobei die

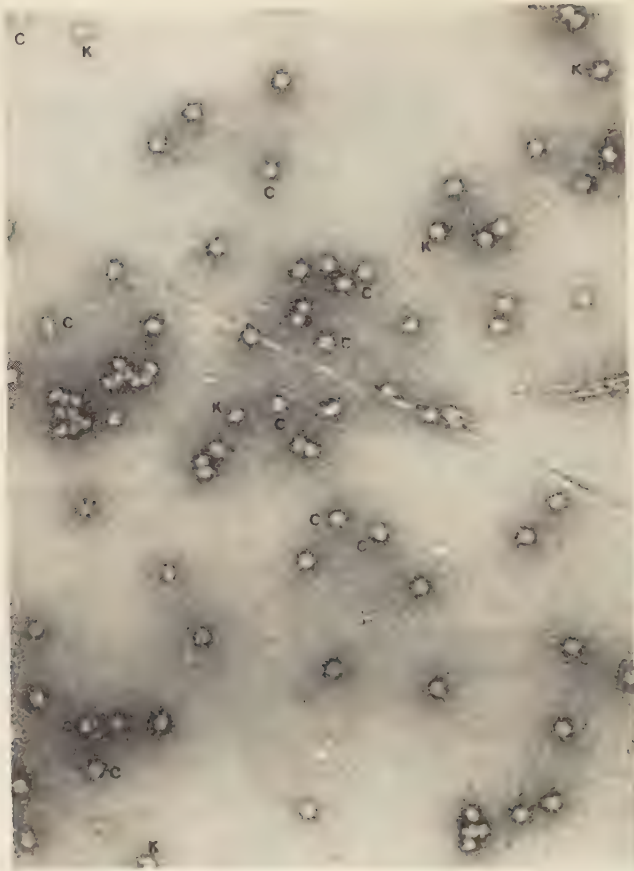


Abb. 24. Übersicht negativ-kontrastierter SOS Untereinheiten

Einige typische "Kronen"- (Crown-C) und "Nieren"- (Kidney-K) Formen sind markiert. Sie treten in einem Verhältnis von ca. zwei "Kronen" zu einer "Niere" auf (s. auch Legende zu Abb. 25). (X 120000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)



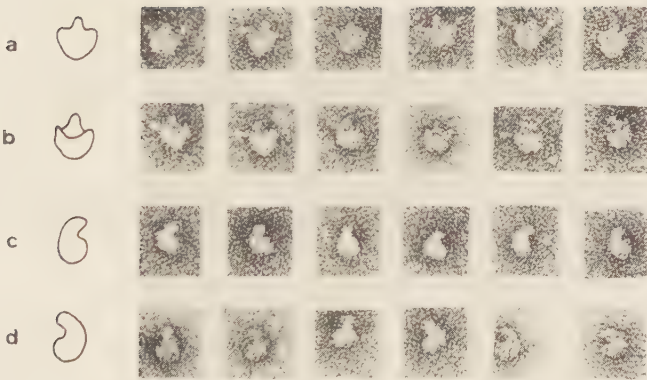


Abb. 25. Galerie ausgewählter Ansichten von SOS Untereinheiten und interpretierende Darstellungen

a: "Kronen-Rückansichten"

b: "Kronen-Frontansichten"

c: "Nieren-Formen", in denen die Kerbe nahe dem oberen sich verjüngenden Pol nach links weist (von der Partikel aus gesehen)

d: "Nieren-Formen", in denen die Kerbe nahe dem oberen Pol nach rechts weist

Etwa die Hälfte aller untersuchten SOS Partikel konnte eindeutig einer der vier Formen zugeordnet werden. 56 von 100 waren "Kronen", davon waren 24 Frontansichten und 32 Rückenprojektionen. 44 von 100 waren "nierenförmig"; in nur drei "Nieren" wies die Kerbe nach rechts. (X 300000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)

"Kronen-Rückansichten" 60-70% aller "Kronen-Formen" ausmachen. Frontansichten der "Kronen" erlauben Aussagen über die dreidimensionale Struktur der 50S Untereinheiten. Diese Formen gleichen einem "Sessel". Dabei entspricht die mittlere große Protuberanz der "Rückenlehne", während die beiden seitlichen Vorsprünge die "Armlehnen" bilden. Diese drei Protuberanzen begrenzen die "Sitzregion", die meistens stark kontrastiert ist.

Die Frontansicht der "Kronen-Form" ist im Folgenden zur Unterscheidung der rechten und linken Partikelseite herangezogen worden. Wie bei der 30S Untereinheit wird bei der Rechts-Links-Orientierung jeweils von der Untereinheit aus gesehen (zur Verdeutlichung s. Abb. 42a).

Auch die "Nieren-Formen" wurden in zwei Projektionen gefunden. In 90-95% aller "nierenförmigen" Untereinheiten weist - wiederum von der Partikel aus gesehen - die asymmetrisch angeordnete Kerbe nach links (Abb. 25c). In nur wenigen "Nieren" ist die Kerbe nach rechts gerichtet (Abb. 25d).

Die folgenden Versuche mit Untereinheiten, die mit Antikörpern gegen 50S-Einzelproteine behandelt waren, ließen den Schluß zu, daß die zwei Hauptprojektionen mit ihren jeweiligen Unterformen verschiedene Ansichten derselben 50S-Struktur sind. Durch Rotation um die Partikellängsachse ist eine Überführung der Projektionen ineinander möglich (s. Abb. 41 u. 42).

Der Abstand zwischen der Spitze der mittleren Protuberanz und der Basis des runden Unterteils variiert bei den "Kronen-Formen" zwischen 200Å und 230Å. Entsprechend sind 220Å für die Distanz zwischen beiden Polen von "Nieren-Formen" ermittelt worden. Die Partikel messen an ihrer breitesten Stelle 160-190Å.

### III.2.2. Lokalisation der Proteine S5, S13 und S14 in 30S-IgG-30S-Komplexen

Um festzustellen, ob IgG-Antikörper unspezifische Effekte auf die strukturelle Integrität von 30S Untereinheiten ausüben, wurden hitzeaktivierte 30S Subpartikel ( $1,0 \text{ OD}_{260}$ ) mit 3 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>30S</sub>" NIS-IgG inkubiert (s. Abschnitt I.2.2.). Nach Auftrennung des Reaktionsgemisches über Rohrzuckergradienten (s. Abb. 3) wurden die in der 30S-Gipfelfraktion vorliegenden Untereinheiten elektronenoptisch betrachtet. Die Formen dieser 30S Subpartikel unterscheiden sich in keiner Weise von denen unbehandelter Untereinheiten (s. Abb. 22 u. 23). Freie Immunglobulin G-Moleküle sind in den Präparaten nicht beobachtet worden.

Wie bei den Untersuchungen in Ergebnisteil I. wurden 30S Untereinheiten mit IgG-Antikörpern gegen Protein S5, S13 oder S14 inkubiert (s. Abschnitt 1.2.2.). Je  $1,0 \text{ OD}_{260}$  30S Subpartikel wurde mit 2 "IgG-Konzentrationseinheiten"  $_{30S}$  "Anti-S5 (113)<sup>\*)</sup>" oder Anti-S13 (143) bzw. mit 3 Einheiten Anti-S14 (306) versetzt und standardmäßig zentrifugiert (s. Abb. 3). Abbildung 26 zeigt eine charakteristische Übersicht von 30S-IgG-30S-Komplexen, die in Dimerfraktionen von unvernetzten Subpartikeln und Antikörpern abgetrennt waren. Die vernetzenden Antikörper - in diesem Fall Anti-S13 - sind in 30% der Dimere klar sichtbar. Während freie Antikörper nicht zu entdecken sind, treten jeweils wenige freie Untereinheiten und größere Aggregate zusammen mit den Dimeren auf. Diese Übersicht ist auch für Anti-S5- und Anti-S14-Dimere repräsentativ, d.h. für Untereinheiten, die durch Anti-S5 bzw. -S14 zu Dimeren verbunden sind.

In der überwiegenden Mehrzahl der Dimere, die durch eine der drei Antikörperpräparationen gebildet wurden, sind die Untereinheiten rotationssymmetrisch (und nicht spiegelsymmetrisch) zueinander angeordnet (Sarma et al., 1971). Die bivalenten IgG-Antikörper vernetzen aufgrund identischer Antigenbindungsgebiete der beiden Fab-Arme zwei Subpartikel an gleichen Positionen auf der Oberfläche, d.h. an gleichen zugänglichen antigenen Determinanten des gleichen Proteins. Nicht mehr als ein Antikörper pro Dimer wurde nachgewiesen. In einigen Fällen war der Antikörperansatzpunkt nur für einen Fab-Arm klar zu erkennen. Auch diese Dimere wurden zur Proteinlokalisierung herangezogen, weil die Untereinheiten in ihrer typischen Rotationssymmetrie orientiert waren.

#### III.2.2.1. S5 ist mit drei Bindungsstellen in der "Hals-Region" der zweigeteilten 30S Untereinheit gelegen

Anti-S5 bindet an drei unterscheidbaren Stellen der "Hals-Region", welche die Brücke zwischen "Kopf" und "Körper" der 30S Untereinheit bildet (Abb. 27): In etwa 30% aller Dimere setzt Anti-S5 noch im Bereich des "Kopfes" an (Abb. 27, Reihe a). In einem weiteren Drittel der Dimere bindet der Antikörper bereits auf dem "Körper", jedoch in unmittelbarer Nähe des "Halses" (Abb. 27, Reihe c). In den restlichen Dimeren ist der Antikörperansatzpunkt direkt im Zentrum des "Halses" gelegen (Abb. 27, Reihe b). Die

---

<sup>\*)</sup> Die Zahlen in ( ) geben die Nummern der immunisierten Tiere an (s. Tabelle 3).

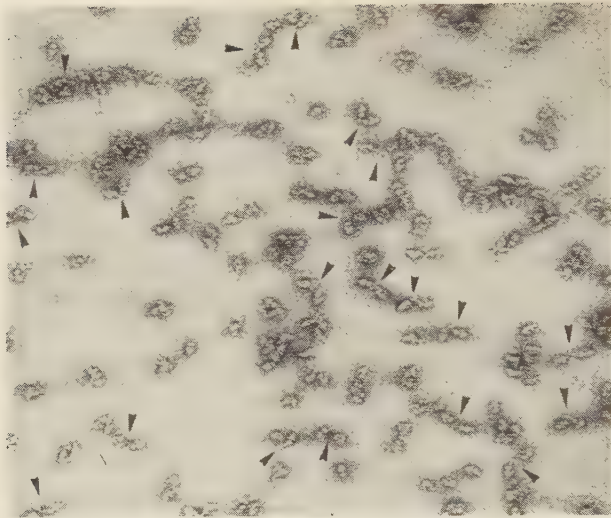


Abb. 26. Übersicht von 30S-IgG-30S-Komplexen, die durch Anti-S13 gebildet werden  
(X 120000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b)

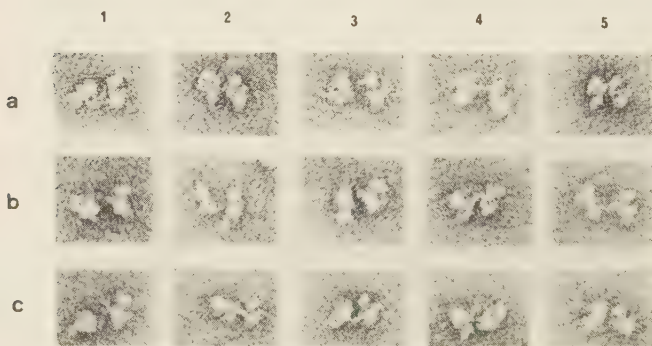


Abb. 27. Galerie vergrößerter Ansichten von 30S-IgG-30S-Komplexen, die durch Anti-S5 gebildet werden  
(X 300000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b)

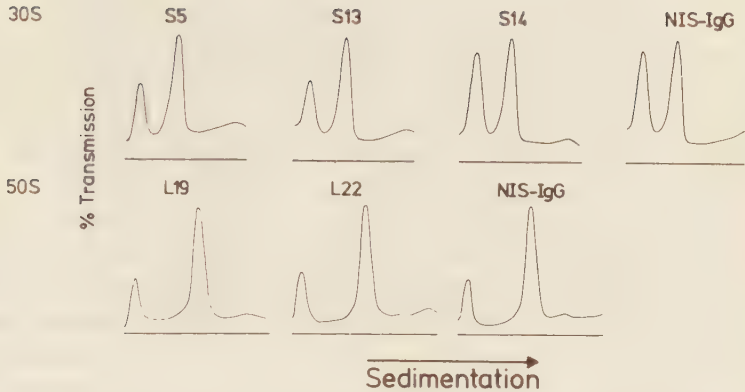


Abb. 28. Vernetzungseigenschaften von IgG-Präparationen, die mit ihrem homologen antigenen Protein absorbiert sind

Je 1,0 OD<sub>260</sub> 30S bzw. 2,0 OD<sub>260</sub> 50S Untereinheiten wurden inkubiert mit:

- 2 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>30S</sub>" Anti-S5 (113)<sup>\*)</sup>
- 2 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>30S</sub>" Anti-S13 (143)
- 3 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>30S</sub>" Anti-S14 (306)
- 3 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>50S</sub>" Anti-L19 (233)
- 3 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>50S</sub>" Anti-L22 (234)
- 3 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>30S,50S</sub>" NIS-IgG

Die Transmissionsprofile wurden bei 260 nm ermittelt:

30S Untereinheiten - Zeiss-PM4-Spektralphotometer und  
Schreiber von Kipp und Zonen

50S Untereinheiten - Uvicord-LKB-Photometer und  
W+W-Electronic-High Speed Recorder

<sup>\*)</sup> Die Zahlen in ( ) geben die Nummern der immunisierten Tiere an.

30S Untereinheiten sind in allen diesen Dimeren in der Regel so orientiert, daß Partikelansichten mit den lappenförmigen Ausstülpungen oder der Grube unter dem "Kopf" nachgewiesen werden. Bezogen auf die Frontprojektion sind die drei Antikörperansatzstellen auf der rechten Seite der 30S Untereinheit dorso-lateral gelegen (s. Abb. 32b u. c).

Die drei Bindungsorte für Anti-S5 sind trotz ihrer engen Nachbarschaft voneinander abzugrenzen; die Distanz zwischen den beiden entferntesten Ansatzstellen beträgt ca.  $60\text{\AA}$ . Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß Protein S5 in einer elongierten Konformation im Ribosom vorliegt (s. Abschnitt 1.2. der Schlußdiskussion).

Zur Absicherung der drei Bindungsstellen für Anti-S5 wurde die Antikörperpräparation mit reinem Protein S5 absorbiert, wie in "Materialien und Methoden" beschrieben. Absorbiertes Anti-S5 sollte nicht mehr mit Ribosomen reagieren und daher auch keine Dimere bilden. Enthielte die IgG-Präparation dagegen verunreinigende Antikörper, sollte, wenn auch nur in geringem Maße, noch Dimerbildung zu beobachten sein. Tatsächlich verhielt sich absorbiertes Anti-S5 wie NIS-IgG: Weder ließ sich die Bildung von 30S-IgG-30S-Komplexen nachweisen (Abb. 28), noch waren bindende Antikörper in den Gipfelfraktionnen mit 30S Untereinheiten elektronenmikroskopisch zu bestimmen (nicht dargestellt). Gleiche Resultate wurden mit absorbiertem Anti-S13 bzw. -S14 und - bei Versuchen mit 50S Untereinheiten - mit Anti-L14, -L17, -L18, -L19, -L22 und -L23 erhalten. Einige Beispiele sind in Abbildung 28 dargestellt.

#### III.2.2.2. S13 und S14 sind im "Kopf" der 30S Untereinheit in benachbarten Positionen gelegen

Anti-S13 bindet in der Polregion des "Kopfes" (Abb. 29). Der Ansatzpunkt ist etwa auf der gedachten Rotationsachse gelegen, wenn die 30S Untereinheit mit der Grube unter dem "Kopf" nach vorn orientiert ist (Abb. 29a/5, b/5, c/1, c/5; s. auch Abb. 32a u. b). Untereinheiten in Seitenansicht, bei denen die lappenförmigen Ausstülpungen von der Partikel aus gesehen nach links weisen, offenbaren einen Bindungsort, der etwas vor dem Pol des "Kopfes" liegt. Diese beiden Positionen entsprechen im dreidimensionalen Modell derselben Region auf dem "Kopf" (s. Abb. 32a u. b).

Auf den ersten Blick scheint Anti-S14 am selben Ort wie Anti-S13 anzusetzen (Abb. 30). Einige Anti-S14-Dimere mit Frontansichten zeigen jedoch klar,



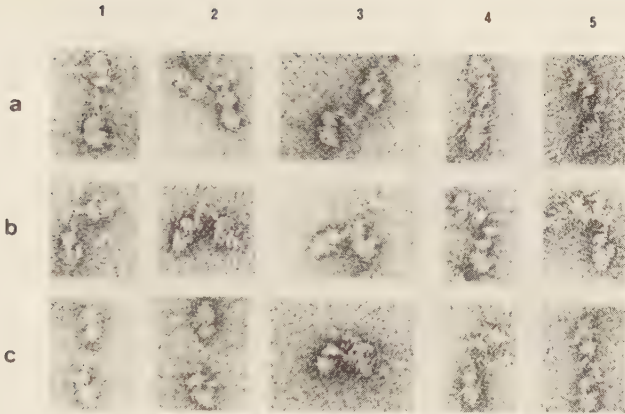


Abb. 29. Galerie vergrößerter Ansichten von 30S-IgG-30S-Komplexen, die durch Anti-S13 gebildet werden

(X 300000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b)

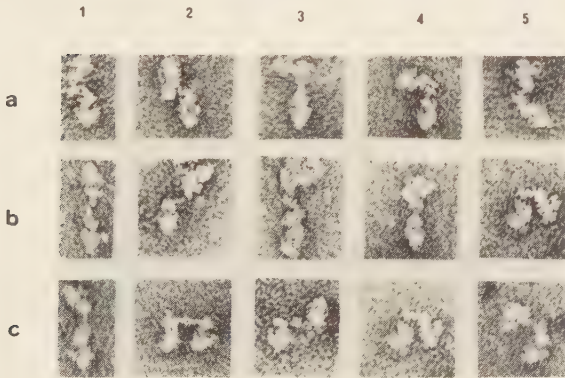


Abb. 30. Galerie vergrößerter Ansichten von 30S-IgG-30S-Komplexen, die durch Anti-S14 gebildet werden

(X 300000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b)

daß die Antikörperbindungsstelle etwas rechts von S13 gelegen ist (s. Abb. 32a). S14 befindet sich also unterhalb des Scheitels an der "Schläfe" des "Kopfes" (s. Abb. 32b). Die Proteine S13 und S14 sind folglich zumindest mit Teilen ihrer Moleküle Nachbarn auf der 30S-ribosomalen Oberfläche.

### III.2.2.3. Ein dreidimensionales Modell der 30S Untereinheit

Die immunelektronenmikroskopischen Studien erlaubten, ein Modell vorzuschlagen, in das sich verschiedene Projektionen der 30S Untereinheit einschließ- lich der Positionen der drei ribosomalen Proteine einfügen lassen (Abb. 32): In einigen Fällen traten spezielle Dimere auf, in denen die beiden Untereinheiten nicht rotationssymmetrisch zueinander angeordnet sind, sondern in unterschiedlichen Projektionen vorliegen (Abb. 31). Aufgrund der Identität der beiden Antigenbindungsgebiete eines IgG-Antikörpers geben die Antikörperbindungsstellen jeweils gleiche Positionen auf den beiden Untereinheiten wieder. Die Analyse solcher Dimere führte zu dem Schluß, daß die verschiedenen Ansichten der 30S Untereinheiten unterschiedliche Projektionen einer einzigen Struktur sind. Durch jeweils  $90^{\circ}$ -Rotation der Partikel um ihre Längsachse sind die Formen ineinander überzuführen. Die speziellen Dimere ermöglichten, dreidimensionale Aussagen über die Positionen auch engbenachbarter Proteine wie S13 und S14 zu treffen.



Abb. 31. Ausgewählte Ansichten (a) und interpretierende Darstellungen (b): 30S Untereinheiten (Spalten 1 und 5) und verschiedene 30S-IgG-30S-Komplexe, die zur Lokalisation der Ansatzstellen für Anti-S5, -S13 und -S14 auf der ribosomalen Oberfläche dienen (Spalten 2-4). (X 300000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974b)

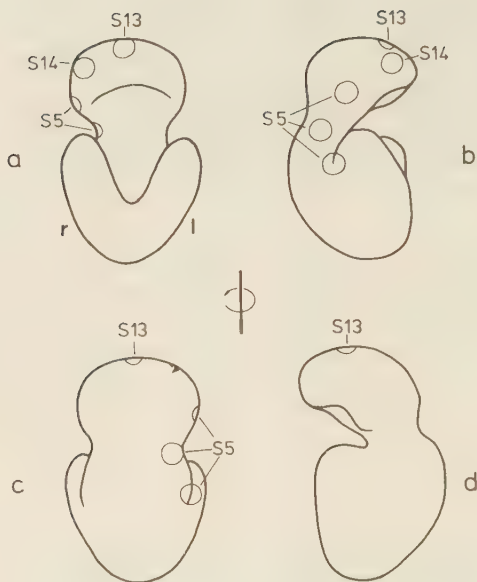


Abb. 32. Dreidimensionales Modell der 30S Untereinheit mit den Positionen der Proteine S5, S13 und S14 auf der Ribosomenoberfläche

Durch Rotation der Formen um  $90^\circ$  um die Partikellängsachse ist Projektion d in a, a in b, b in c und c in d überzuführen. Die Markierungen geben die erreichbaren antigenen Determinanten der Proteine an. Rechts-Links-Orientierungen werden im Text jeweils von der Partikel aus gesehen vorgenommen (r= rechts; l=links). (Abbildung modifiziert nach Tischendorf et al., 1975)

### III.2.3. Lokalisation der Proteine L14, L17, L18, L19, L22 und L23 in 50S-Antikörper-50S-Komplexen

Zum Ausschluß möglicher unspezifischer Effekte auf die strukturelle Integrität der 50S Untereinheiten durch Antikörper wurden 2,0 OD<sub>260</sub> isolierte 50S Subpartikel mit 3 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>50S</sub>" NIS-IgG oder 100 µl unfractioniertem NIS-γ-Globulin inkubiert (s. Abschnitt I.2.3.), über Rohrzuckergradienten aufgetrennt (s. Abb. 4) und anschließend elektronenoptisch betrachtet. Der Vergleich mit unbehandelten Untereinheiten (s. Abb. 24 u. 25) ergab, daß die Inkubation mit NIS-Antikörpern keine nachweisbaren Veränderungen der 50S Subpartikel hervorruft (nicht dargestellt). Durch die Zentrifugation ließen sich die Untereinheiten vollkommen von den Immunglobulinen separieren; es traten keine Antikörper in den 50S-Gipfelfractionen auf.

Wie in Abschnitt I.2.3. beschrieben, wurden je 2,0 OD<sub>260</sub> 50S Untereinheiten mit IgG-Präparationen bzw. unfractionierten γ-Globulinen gegen 50S-Einzelproteine inkubiert. Von Anti-L14 (294)<sup>\*)</sup>, -L18 (260), -L19 (233) und -L23 (235) wurden jeweils 3 "IgG-Konzentrationseinheiten<sub>50S</sub>" und von Anti-L17 (393) und -L22 (234) je 100 µl unfractioniertes γ-Globulin eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden über Dichtegradienten aufgetrennt und die Dimerfraktionen mit den 50S-Antikörper-50S-Komplexen isoliert (s. Abb. 4). Die elektronenmikroskopisch bestimmten Antikörperbindungsstellen auf der 50S-Oberfläche waren voneinander klar abzugrenzen; sie ließen sich unterscheidbaren Orten auf der 50S Untereinheit zuordnen: der konvexen Seite der "Nieren-Form", der unregelmäßigen, konkaven Seite der "Niere" bzw. Markierungspunkten der "Kronen-Form".

#### III.2.3.1. L17 und L22 sind auf der konvexen Seite der "Nieren-Form" gelegen

Eine typische Übersicht von Dimeren, die durch Anti-L22, eine unfractionierte γ-Globulin-Präparation, gebildet wurden, gibt Abbildung 33. Nur wenige Untereinheiten (<10%) kommen unvernetzt oder in größeren Aggregaten als Dimere vor. Der vernetzende Antikörper ist in den meisten Fällen sichtbar. In der Regel liegen sich zwei "Nieren" mit ihren konvexen Seiten gegenüber, wobei die Partikel rotationssymmetrisch zueinander angeordnet sind.

Um klare Aussagen über die Position der Antikörperbindungsstelle zu bekommen,

<sup>\*)</sup> Die Zahlen in ( ) geben die Nummern der immunisierten Tiere an (s. Tabelle 4).

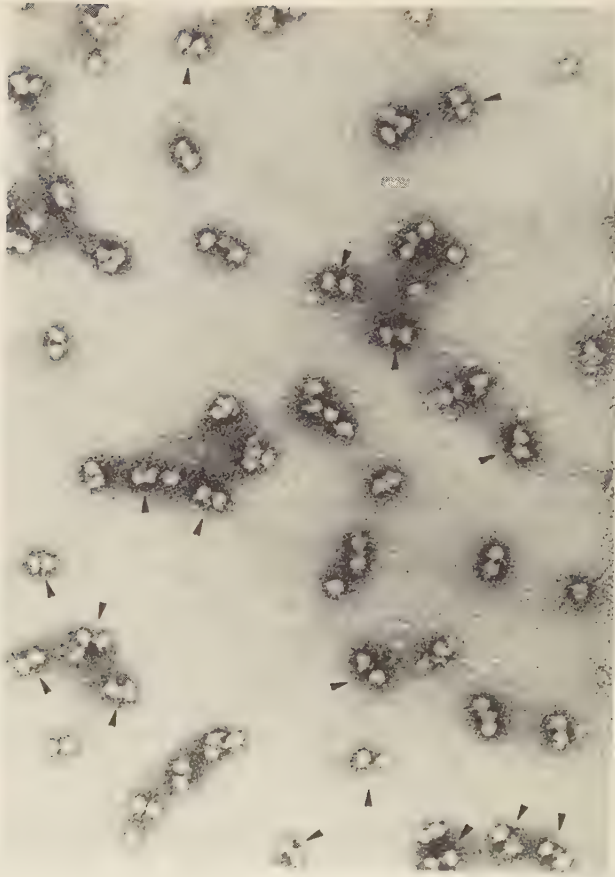


Abb. 33. Übersicht von 50S-Antikörper-50S-Komplexen, die durch Anti-L22 gebildet werden

Die Partikel stellen hauptsächlich "Nieren-Formen" dar. (X 135000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)



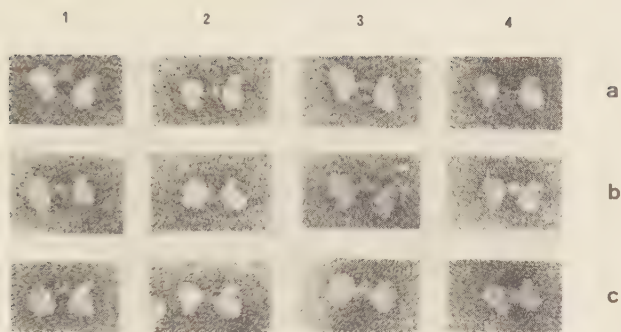


Abb. 34. Galerie vergrößerter Ansichten von SOS-Antikörper-SOS-Komplexen, die durch Anti-L22 gebildet werden

Vier der Dimere sind der Übersicht in Abb. 33 entnommen. (X 280000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)

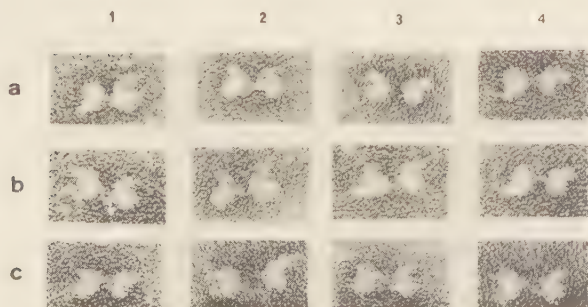


Abb. 35. Galerie vergrößerter Ansichten von SOS-Antikörper-SOS-Komplexen, die durch Anti-L17 gebildet werden

Die in Reihe a (1-3) dargestellten Dimere enthalten Untereinheiten, die jeweils einer der vier beschriebenen Hauptprojektionen entsprechen (s. Abb. 25). (X 280000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)

wurden Ausschnitte vergrößert (Abb. 34). Anti-L22 setzt an der konvexen Seite der "Nieren-Form" an, und zwar in Höhe der "Nieren-Kerbe".

Der vernetzende Antikörper besitzt in einigen Fällen eine kompaktere Struktur, als bei den Untersuchungen mit 30S Untereinheiten beobachtet wurde. Es ist möglich, daß es sich bei den hier dargestellten Immunglobulinen teilweise um IgM- oder IgA-Antikörper handelt, die neben IgGs in unfraktioniertem  $\gamma$ -Globulin enthalten sind.

Die Rotationssymmetrie wird bei einigen selektionierten Dimeren besonders deutlich. In diesen Dimeren weist die eine Untereinheit mit ihrem sich verjüngenden Pol und der Kerbe nach oben, während in der anderen Subpartikel die beiden Orientierungsmerkmale nach unten deuten (Abb. 34; s. Abb. 41a u. b, Spalte 2, Reihe A).

Unfraktioniertes  $\gamma$ -Globulin Anti-L17 bildete Untereinheiten-Komplexe, die den Anti-L22-Dimeren ähnlich sind (Abb. 35). Anti-L17 bindet ebenfalls an der gleichmäßigen, konvexen Seite der "Nieren-Form", jedoch in deutlichem Abstand von der Anti-L22-Ansatzstelle (s. die schematische Darstellung in Abb. 42).

In einigen Dimeren, die durch Anti-L17 gebildet wurden, liegen die Untereinheiten nicht rotationssymmetrisch zueinander angeordnet vor. In diesen speziellen Dimeren ist eine "nierenförmige" Untereinheit mit einer Subpartikel in der "Kronen-Frontansicht" vernetzt (s. Abb. 41a u. b; als Beispiel s. Spalte 2, Reihe C). Der Antikörper deutet mit einem Arm zum Rücken der "Krone" und bindet mit dem anderen an die konvexe "Nierenseite". Daraus kann geschlossen werden, daß der "Kronen-Rücken" mit der konvexen "Nierenseite" identisch ist.

#### III.2.3.2. L14, L19 und L23 sind auf der konkaven Seite der "Nieren-Form" gelegen

50S Untereinheiten, die durch Anti-L14, -L19 bzw. -L23 (jeweils IgG-Präparationen) zu Dimeren vernetzt wurden, zeigen vorwiegend die Ansicht der "Nieren-Form". Die Bindungsorte für die Antikörper sind allesamt auf der konkaven Seite in der Kerben-Region gelegen und die Untereinheiten in der Regel rotationssymmetrisch zueinander orientiert. Es fällt auf, daß die Abstände der Subpartikel voneinander in Dimeren, die durch Anti-L19, -L14 bzw. -L23 gebildet wurden, geringer sind als in allen anderen untersuchten Aggregaten (Anti-L17-, -L22- und -L18-Dimere).

Der vernetzende Antikörper ist in Anti-L19-Dimeren seltener sichtbar als in den Dimeren, die durch Anti-L17 oder -L22 gebildet wurden (s. Pfeile in der Übersichtsabbildung 36). Aufgrund der charakteristischen rotationssymmetrischen Anordnung der Subpartikel in diesen Komplexen ohne sichtbaren Antikörper kann gefolgert werden, daß es sich um echte 50S-IgG-50S-Komplexe handelt, die jedoch natürlicherweise eine Bestimmung des Antikörperansatzpunktes nicht zulassen.

Eine ausreichende Anzahl von Komplexen, in denen der verbindende Antikörper sichtbar ist, konnte selektioniert werden, um L19 auf der 50S-ribosomalen Oberfläche zu lokalisieren (Abb. 37). Einige spezielle Dimere weisen Untereinheiten in der "Kronen-Projektion" auf und erlauben somit eine noch genauere Bestimmung des Bindungsortes (Abb. 41 u. 42). L19 ist mit seiner zugänglichen antigenen Determinante in der gewölbten "Sitzregion" etwas rechts von der mittleren Protuberanz gelegen. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Wabl (1973, 1974) überein.

Die durch Anti-L14 bzw. -L23 vernetzten Untereinheiten treten in etwa gleicher Verteilung wie die Anti-L19-Dimere auf (nicht dargestellt). Die Antikörper sind in diesen beiden Fällen in nur ca. 30% der Dimere sichtbar (Abb. 38a u. b). Anti-L14 und -L23 binden in der Nähe von Anti-L19 (Abb. 37 u. 38, s. ferner Abb. 41 u. 42). L14 ist im Zentrum des gewölbten "Sitzes", L19 rechts von L14 gelegen. Die Position von Protein L23 befindet sich ebenfalls im "Sitz", jedoch weiter vorn als die der beiden anderen Proteine.

L14, L19 und L23 sind mit verschiedenen Methoden als Proteine bestimmt worden, die im Untereinheiten-Grenzbereich vorkommen (s. Abschnitt 1.1. der Schlußdiskussion). Es ist also zulässig zu folgern, daß die 30S Untereinheit

#### Legenden zu Abbildung 36 und 37:

Abb. 36. Übersicht von 50S-IgG-50S-Komplexen, die durch Anti-L19 gebildet werden

Dimere mit sichtbaren Antikörpern sind mit Pfeilen markiert. (X 120000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)

Abb. 37. Vergrößerte Ansichten von 50S-IgG-50S-Komplexen, die durch Anti-L19 gebildet werden

Es werden überwiegend "Kronen-Formen" beobachtet. Neun der Dimere sind der Übersicht in Abb. 36 entnommen. (X 300000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)

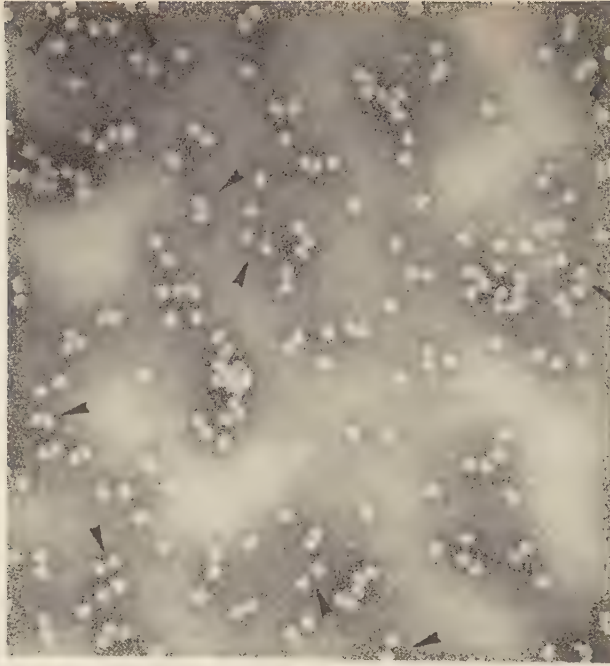


Abb. 36

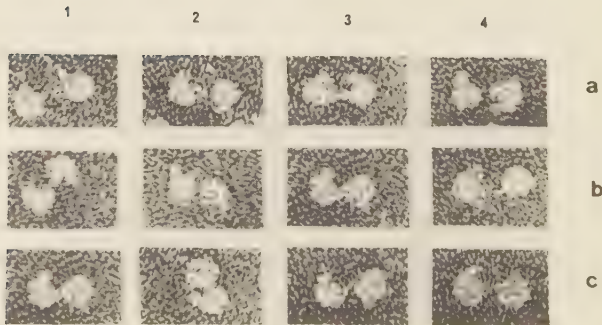


Abb. 37

Legenden s. S. 205,

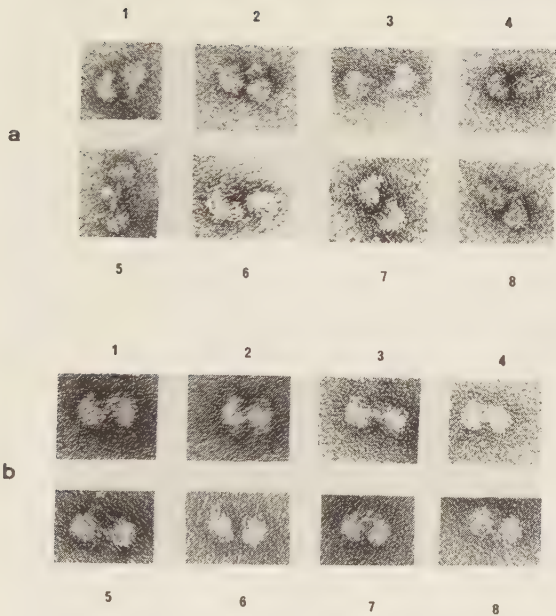


Abb. 38. Vergrößerte Ansichten von SOS-IgG-SOS-Komplexen, die durch Anti-L14 (a) und Anti-L23 (b) gebildet werden

Der Ansatzpunkt von Anti-L14 im Zentrum der Kerbe (a/1) bzw. im Zentrum der gewölbten "Sitzregion" (a/2 und a/5) ist deutlich zu erkennen. (X 260000: a/1-a/5, a/8; X 300000: a/6, a/7 und b/1-b/8) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)



in der "Sitzregion" der "Kronen-Form" bzw. in der Gegend der Kerbe "nierenförmiger" Projektionen mit der SOS Subpartikel kombinieren sollte.

### III.2.3.3. L18 liegt an einer der lateralen Protuberanzen der "Kronen-Form"

Die durch IgG Anti-L18 gebildeten Dimere haben eine andere Struktur als die bisher betrachteten. Die Untereinheiten treten fast ausschließlich in der "Kronen-Projektion" auf (Abb. 39). Vergrößerte Ausschnitte zeigen, daß Anti-L18 an der Außenseite einer der lateralen Protuberanzen ansetzt, und zwar nicht an der Spitze des Vorsprungs, sondern ca. 30 Å nach unten versetzt (Abb. 40, s. Abb. 41 u. 42). Die Antikörperbindungsstelle ist von der Partikel aus gesehen an der "linken" Protuberanz rotationssymmetrisch angeordneter Untereinheiten in "Kronen-Rückansicht" gelegen. Konventionsgemäß werden Rechts-Links-Orientierungen jedoch an Aufsichten von "Kronen-Frontansichten" durchgeführt. Die Position von L18 befindet sich also an der rechten "Armlehne" des "SOS-Sessels".

Diese Aussage läßt sich ohne Schwierigkeiten treffen, weil die vernetzenden IgG-Antikörper in den meisten Dimeren deutlich sichtbar sind. Für die Antikörper werden sowohl Y- als auch T-förmige Strukturen beobachtet (Abb. 39). Beide IgG-Formen sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Valentine und Green, 1967; Werner et al., 1972; Pilz et al., 1973).

Die Dimere, die durch Anti-L18 gebildet wurden, zeigen gegenüber den zuvor charakterisierten Komplexen einige Besonderheiten:

1. Die Abstände zwischen den Untereinheiten in den Anti-L18-Dimeren sind in der Regel größer als in den übrigen Fällen.
2. Es werden hauptsächlich Subpartikel in "Kronen-Rückansicht" in Anti-L18-Dimeren nachgewiesen, obwohl diese Ansicht bei der Untersuchung unbehandelter SOS Untereinheiten nur 30% der vier beschriebenen Projektionsformen, bzw. 60-70% aller "Kronen" ausmacht (s. Abb. 24 u. 25). Aus diesem Ergebnis ist abzuleiten, daß der gebundene Antikörper für bestimmte Untereinheitenstrukturen in Dimeren eine bevorzugte Anhaftung an den Kohlefilm hervorruft.

In einigen speziellen Dimeren wurde L18 nicht an der rechten Protuberanz, sondern an der "Sitzkante" rechts von der Symmetrieachse der SOS Untereinheit durch Antikörper markiert (s. dazu auch Abb. 44). Da noch nicht entschieden ist, ob L18 in einer oder zwei Kopien/SOS Untereinheit vorliegt (Weber, 1972; Hardy, 1975), bleibt es offen, ob die beiden Bindungsstellen einer einzigen Proteinkopie oder beiden Kopien zuzuordnen sind.





Abb. 39. Übersicht von LOS-IgG-5S-Komplexen, die durch Anti-L18 gebildet werden

Die Untereinheiten in den Dimeren sind hauptsächlich "Kreuzen-förmig". Der vernetzende Antikörper ist in den meisten Fällen deutlich sichtbar (s. Pfeile). (X 175000) (aus Tischendorf, Reichardt und Stöffler, 1974a)

### III.2.3.4. Ein dreidimensionales Modell der 50S Untereinheit

Es ist ein Modell entworfen worden, in das sich die verschiedenen Projektionen der 50S Untereinheit und die Positionen der sechs ribosomalen Proteine auf der 50S-Oberfläche einfügen lassen (Abb. 42). Besondere Hilfe dabei leisteten die speziellen 50S-Antikörper-50S-Komplexe, in denen die Untereinheiten voneinander abweichende Projektionen aufweisen. Ausgewählte Beispiele sind in Abbildung 41 dargestellt.

Wie schon vorn erläutert, markieren Antikörper, die eine "Kronen-Form" mit einer "Niere" vernetzen, aufgrund ihrer identischen Antigenbindungsgebiete gleiche Oberflächenstrukturen auf den beiden Untereinheiten. Durch Analyse der speziellen Dimere konnte gefolgert werden, daß alle vier Ansichten der 50S Untereinheit durch Rotation um die Partikellängsachse ineinander überzuführen, also Projektionen einer einzigen Struktur sind. Darüber hinaus erlaubten erst diese Dimere, die Antikörperansatzstellen engbenachbarter Proteine wie L14, L19 und L23 dreidimensional zu lokalisieren (Abb. 41 u. 42).

Alle immunoelektronenoptischen Ergebnisse werden im Zusammenhang mit den übrigen Daten zur Topographie des Ribosoms ausführlich in der Schlußdiskussion behandelt.

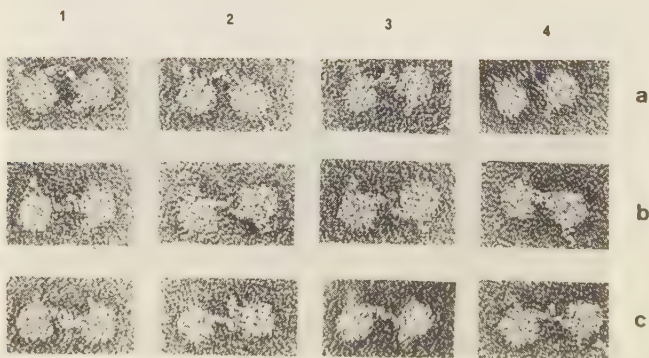


Abb. 40. Galerie vergrößerter 50S-IgG-50S-Komplexe, die durch Anti-L18 gebildet werden

(X 320000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)



Abb. 41. Ausgewählte Ansichten (a) und interpretierende Darstellungen (b): 50S Untereinheiten (Spalten 1 und 6) und 50S-IgG-50S-Komplexe, die zur Lokalisation der Ansatzstellen für Anti-L14, -L17, -L18, -L19, -L22 und -L23 auf der ribosomalen Oberfläche dienen (Spalten 2-5). (X 260000-320000) (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)

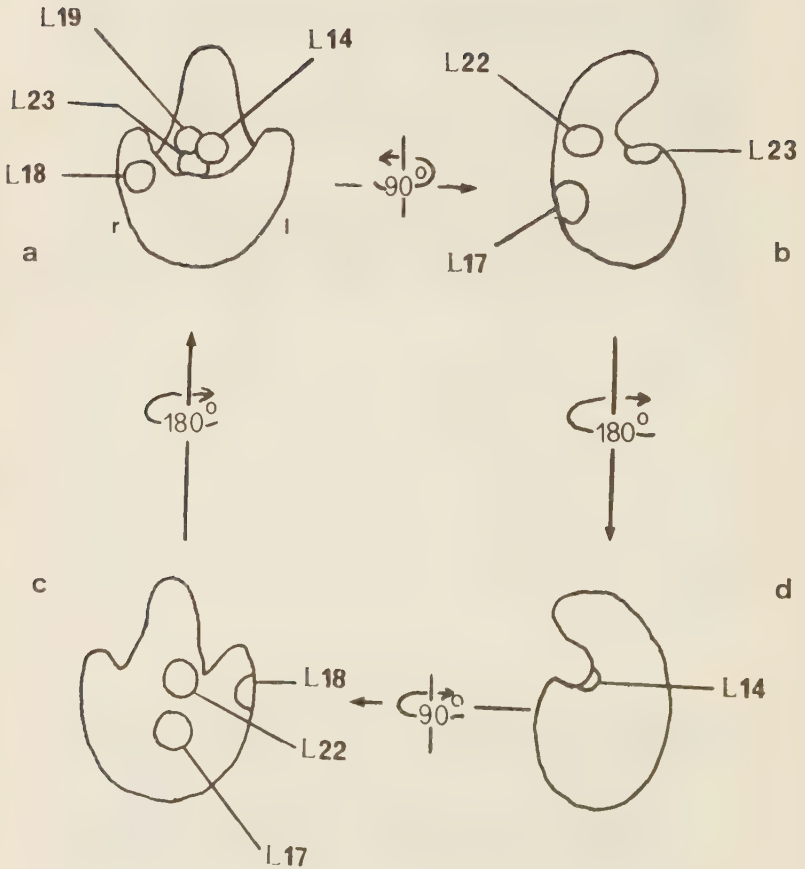


Abb. 42. Dreidimensionales Modell der 50S Untereinheit mit den Positionen von sechs Proteinen auf der Ribosomenoberfläche

Die Projektionen sind durch Rotation um  $90^\circ$  um die Partikellängsachse ineinander überzuführen. Die Markierungen geben die erreichbaren antigenen Determinanten der Proteine an. Rechts-Links-Orientierungen werden im Text von der Partikel aus gesehen vorgenommen (r=rechts; l=links). (aus Tischendorf, Zeichhardt und Stöffler, 1974a)

### III.3. Diskussion

#### III.3.1. Form der Untereinheiten

##### a. Die 30S Untereinheit

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der kleinen Untereinheit des E.coli-Ribosoms sind von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt worden (zur Übersicht s. van Holde und Hill, 1974). Es wurden ausschließlich Formen nachgewiesen, die auf ellipsoide Grundstrukturen zurückzuführen sind. Neben abgeflachten Partikeln (Huxley und Zubay, 1960; Amelunxen, 1971) wurden hauptsächlich gestreckte Untereinheiten mit Dimensionen beschrieben, denen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Maße sehr nahe kommen (Hall und Slayter, 1959; Amelunxen, 1971; Wabl, 1973; Wabl et al., 1973a, b; Lake et al., 1974a, b). Zweigeteilte, gestreckte Partikel, die in ihren strukturellen Merkmalen den in Abschnitt III.2.1.1. beschriebenen Subpartikeln nahezu gleichen, wurden dabei von Amelunxen (1971), Wabl (1973), Wabl et al. (1973a, b) und Lake et al. (1974a, b) gefunden. Die in dieser Arbeit immunelektronenoptisch nachgewiesene Überführbarkeit der einzelnen Untereinheiten-Projektionen ineinander stimmt mit Ergebnissen goniometrischer Studien überein (Wabl et al., 1973a).

Im Gegensatz zu den meisten elektronenoptischen Befunden ist die 30S Untereinheit nach Röntgen-Kleinwinkelstreuungsversuchen ein abgeflachtes Rotationellipsoid (Hill et al., 1969b; Smith, 1971; Hill und Fessenden, 1974; zur Übersicht s. van Holde und Hill, 1974). Die mittels Elektronenmikroskopie und Kleinwinkelstreuung ermittelten Modelle lassen sich nicht miteinander in Einklang bringen; ein Vergleich zwischen einer experimentell bestimmten Streukurve und einer berechneten Kurve für ein elektronenoptisch ermitteltes Modell, das in Form und Dimensionen dem von Wabl et al. (1973a, b) beschriebenen entspricht, ergab keine Übereinstimmung. Die Widersprüchlichkeit der Resultate beider Methoden läßt sich zur Zeit nicht erklären. Der von van Holde und Hill (1974) erhobene Einwand, daß die 30S Untereinheiten bei der Präparation elektronenmikroskopischer Proben wegen zu niedriger  $Mg^{++}$ -Konzentration als inaktive und möglicherweise desintegrierte Partikel untersucht wurden, erscheint unberechtigt: 1. Nach Zamir et al. (1971) werden 30S Untereinheiten bei 20 mM  $Mg^{++}$  zu maximaler Bindungskapazität für Aminoacyl-tRNA aktiviert. Derart behandelte Untereinheiten lassen sich jedoch elektronenoptisch nicht von solchen Subpartikeln unterscheiden, die bei niedriger  $Mg^{++}$ -Konzentration (0,3-1,0 mM  $Mg^{++}$ ) untersucht werden. 2. Obwohl nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, daß in den Partikeln bei

der Fixierung und Negativ-Kontrastierung eine Veränderung oder gar Zerstörung der strukturellen Integrität auftritt, werden doch stets einheitliche Partikel betrachtet: Nach den Untersuchungen dieser Arbeit und den Befunden der meisten oben erwähnten Autoren haben die 30S Untereinheiten reproduzierbare Formen.

#### b. Die 50S Untereinheit

Die 50S Subpartikel wurden mittels elektronenmikroskopischer Studien von einigen Arbeitsgruppen als abgeflacht ellipsoide Partikel beschrieben (Hall und Slayter, 1959; Hart, 1962; Spiess, 1973; zur Übersicht s. van Holde und Hill, 1974). Nach anderen Autoren besitzen die 50S Untereinheiten irreguläre Formen mit Dimensionen und Ansichten ("nierenförmige" Partikel, runde Formen, runde Formen mit einer "Nase", "Ahornblatt"-ähnliche Untereinheiten und "Kronen-Ansichten"), die den im Abschnitt III.2.1.2. nachgewiesenen "nieren-" und "kronenförmigen" Subpartikeln entsprechen (Huxley und Zubay, 1960; Lubin, 1968; Wabl, 1973, 1974; Wabl et al., 1973a; Lake et al., 1974b). Auch die von Bruskov und Kiselev (1968) als halbzyklindrisch oder bogenförmig beschriebenen Ansichten der 50S Untereinheit dürften mit den in dieser Arbeit gezeigten Projektionen in Einklang sein. Geringe Abweichungen in den Formen könnten jedoch auf unterschiedliche Präparations-, Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden zurückzuführen sein. Uneinigkeit bestand bislang darüber, ob die zwei beobachteten Hauptformen ("Krone" und "Niere") verschiedene Strukturen der 50S Untereinheiten darstellen (Wabl et al., 1973a) oder aber abweichende Projektionen ein und derselben Struktur sind (Lubin, 1968). Die hier durchgeführte Untersuchung von Ribosomen-Antikörper-Komplexen zeigte eindeutig, daß die unterschiedlichen Ansichten der 50S Untereinheiten durch Rotation um die Partikellängsachse ineinander überzuführen sind.

Nach Röntgenkleinwinkel-Streuungsuntersuchungen sind die 50S Subpartikel a. abgeflachte oder triaxiale Ellipsoide oder b. ellipsoide Zylinder, die aber beide so ähnliche Dimensionen aufweisen, daß sie gleiche Rauminhalte haben (Hill et al., 1969b; Tolbert, 1971; zur Übersicht s. van Holde und Hill, 1974). Interessanterweise war für die 50S Subpartikel anders als für die 30S Untereinheiten Übereinstimmung zwischen Modellen zu finden, die aus Kleinwinkel-Streuungsdaten und elektronenmikroskopischen Resultaten ermittelt wurden. Für die von Bruskov und Kiselev (1968) und Lubin (1968) elektronenoptisch gefundenen Formen wurden theoretische Streuungskurven



berechnet, die mit experimentell ermittelten Kurven annähernd bzw. gut zur Deckung zu bringen waren (Tolbert, 1971; zitiert in van Holde und Hill, 1974).

### III.3.2. Eigenschaften und Limitationen der immunelektronenmikroskopischen Studien

Die folgenden erfüllten Bedingungen haben den Experimenten zur eindeutigen Lokalisation ribosomaler Proteine in situ zugrunde gelegen:

1. Die elektronenoptisch nachgewiesene Struktur ribosomaler Untereinheiten in Antigen-Antikörper-Komplexen entspricht der unbehandelten Kontrollpartikel.
2. Die Antikörperpräparationen, die zur Markierung von Einzelproteinen auf der Ribosomenoberfläche verwendet wurden, besaßen keine verunreinigenden Aktivitäten gegen heterologe Proteine (Stöffler und Wittmann, 1971a; Stöffler, Tischendorf, Hasenbank und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Mit dem homologen antigenen Protein absorbierte Antikörper waren frei von präzipitierenden IgGs (s. Abb. 28).
3. Aufgrund der Identität der Antigenbindungsbereiche eines bivalenten IgG-Antikörpers werden auf beiden in Dimeren verbundenen Untereinheiten gleiche Oberflächenpositionen markiert. Das Auftreten von Dimeren, in denen nicht wie üblich zwei Untereinheiten einer Projektion rotationssymmetrisch angeordnet waren, sondern jede Subpartikel in jeweils einer anderen Projektion vorlag, erlaubte die Zuordnung gleicher Oberflächenmerkmale in unterschiedlich projizierten Untereinheiten. Dadurch waren Aussagen über die dreidimensionale Struktur der Ribosomen-Untereinheiten mit Ortsangaben für ribosomale Proteine möglich (s. Abb. 31, 32, 41 u. 42).

50S Untereinheiten in Dimeren besitzen andere Adsorptionseigenschaften an den Kohlefilm als freie Subpartikel. Während "Kronen-" und "Nieren-Formen" unbehandelter 50S Untereinheiten stets in Verhältnissen zwischen 2:1 und 1:1 vorlagen, wiesen Dimere, die durch Anti-L14, -L17, -L19, -L22 und -L23 gebildet wurden, hauptsächlich "nierenförmige" Projektionen auf. Anti-L18-Dimere enthielten ausschließlich "Kronen-Rückansichten".

Die Antikörperpräparationen gegen die sechs 50S-Proteine bildeten Dimere, in denen die Untereinheiten je nach verwendetem Antikörper in unterschiedlichen Abständen voneinander vorkamen. 50S Untereinheiten in Anti-L14-,

-L19- und -L23-Dimeren lagen sich näher gegenüber als Untereinheiten, die durch Anti-L17, -L18 und -L22 vernetzt waren. Durch Anti-L18 verbundene SOS Subpartikel hatten dabei den größten Abstand voneinander. Dieser Unterschied läßt sich dadurch erklären, daß die Antikörperansatzstellen für Anti-L14, -L19 und -L23 im Gegensatz zu denen von Anti-L17, -L18 und -L22 in einer Einbuchtung der SOS Untereinheit vorliegen (in der Kerbenregion von "Nierenprojektionen" bzw. im "gewölbten Sitz" von "Kronen-Frontansichten"), wodurch das IgG-Molekül optisch verkürzt erscheint.

Gegenüber früheren Untersuchungen (Wabl, 1973, 1974; Wabl et al., 1973b; Wabl, Garrett und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse) wurden für die Experimente dieser Arbeit verfeinerte Techniken gewählt:

Die angewendete Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation ermöglichte im Gegensatz zu der beschriebenen Gelfiltration über Sepharose-Säulen die Isolierung von Dimeren, die frei von höhervernetzten Aggregaten sind. Durch die Einführung eines zweiten "vorgefärbten" Kohlefilms bei der Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie war das Kontrastierungsmittel stets gleichmäßig intensiv verteilt. Die Negativkontrastierungsmethode wurde durch dieses "Sandwich" eine einfachere und verlässlichere Technik (s. "Materialien und Methoden").

Protein L19 wurde bereits früher in der Kerbe von "SOS-Nieren-Ansichten" ermittelt (Wabl, 1973, 1974; Wabl, Garrett und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine genaue Lokalisation von L19 war jedoch nicht möglich, weil keine speziellen Dimere mit "Kronen-Projektionen" nachgewiesen wurden.

Lake et al. (1974a) lokalisierten kürzlich S14 auf dem kleinen "Kopf" der 30S Untereinheit. Obwohl die Autoren keine eindeutigen Aussagen über den dreidimensionalen Aufbau der Subpartikel machen konnten, lassen sich die Resultate an Hand des in Abbildung 32 dargestellten Modells wie folgt interpretieren: Anti-S14 bindet nicht, wie in dieser Arbeit beschrieben, an der "Schläfe" des "Kopfes" (s. Abb. 32), sondern in unmittelbarer Nähe des Scheitels, in einer Region also, in der Protein S13 vorliegt (s. Abb. 32). Einige der von Lake et al. gezeigten Dimere weisen zwei verbindende IgGs auf. Daraus kann gefolgert werden, daß S14 zwei antigene Determinanten erreichbar hat.

Die unterschiedliche Lokalisation von S14 könnte - bedingt durch individualspezifische Unterschiede der verwendeten Antikörper - auf die Markierung

verschiedener antigenen Determinanten des Proteins zurückzuführen sein. Zieht man in Betracht, daß ribosomale Proteine in situ elongiert sein können, ist - wie für S5 - für solche Proteine der Nachweis von mehr als einer Antikörperbindungsstelle zu erwarten (s. Abb. 43 u. 44 sowie die ausführliche Diskussion in Abschnitt 1.2. der Schlußdiskussion).

### III.3.3. Ortsangaben für weitere Proteine im Ribosom

In Fortführung dieser Untersuchungen wurden in letzter Zeit weitere Proteine auf der Oberfläche der 30S bzw. 50S Untereinheit lokalisiert (Tischendorf et al., 1975; Stöffler und Tischendorf, 1975). Eine Auswahl dieser Ergebnisse ist in den Abbildungen 43 und 44 zusammengefaßt. Auf diese Schemata wird in der folgenden Schlußdiskussion Bezug genommen.

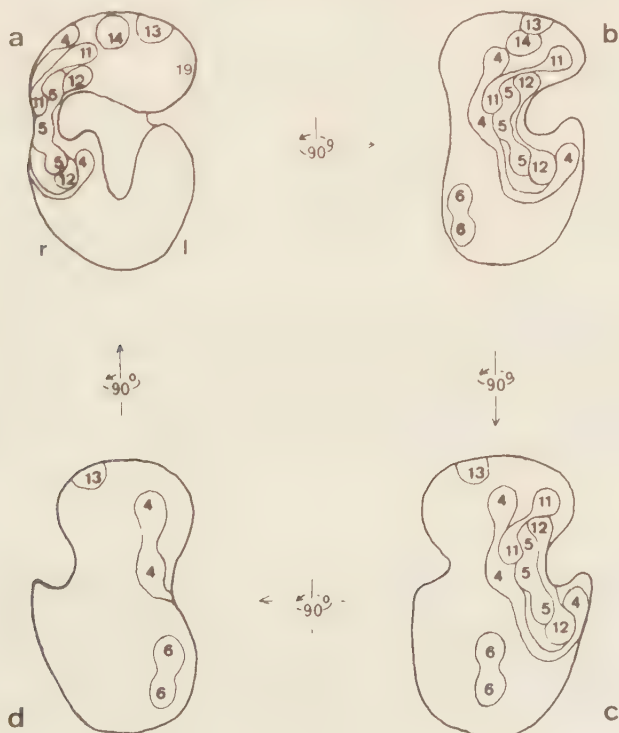


Abb. 43. Dreidimensionales Modell der 30S-ribosomalen Untereinheit mit den Positionen von acht Proteinen

Legende s. S. 218.

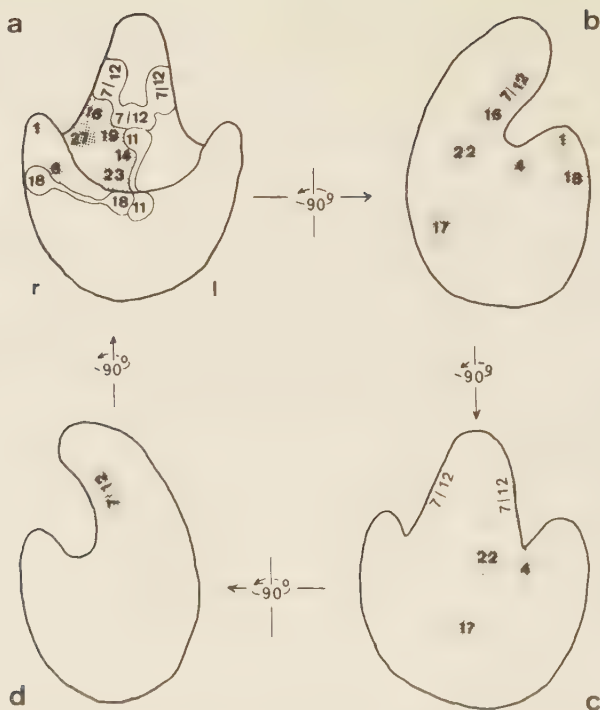


Abb. 44. Dreidimensionales Modell der 50S-ribosomalen Untereinheit mit den Positionen von zwölf Proteinen

Mit einem Raster versehene Zahlen geben Proteine mit nur einer Antikörperbindungsstelle auf der dem Betrachter zugewandten Projektion wieder. Für weitere Einzelheiten s. die Legende zu Abb. 43. (r=rechts; l=links) (Abbildung modifiziert nach Stöffler und Tischendorf, 1975)

#### Legende zu Abb. 43:

Die Zahlen verdeutlichen die Bindungsorte der entsprechenden Antikörper. Von einem Kreis umschlossene Zahlen bedeuten, daß die jeweiligen Proteine nur an einer Stelle der Ribosomenoberfläche markiert werden. Bei Proteinen mit mehreren Bindungsstellen werden die einzelnen Zahlen gemeinsam umrandet. Diese Darstellungsweise gibt die hypothetische Form elongierter Proteine wieder. Umrandete Zahlen stehen für Bindungsstellen, die auf dem "Horizont" der Subpartikel liegen. Abb. 43a zeigt keine direkte Frontansicht wie Abb. 32a, sondern eine - von der Partikel aus gesehen - etwas nach links gedrehte Seiten-Frontansicht. Entsprechend sind die Projektionen in Abb. 43b-d im Vergleich zu Abb. 32b-d etwas seitlich orientiert. (r=rechts; l=links) (Abbildung modifiziert nach Stöffler und Tischendorf, 1975)

## E. Schlußdiskussion

Die Schlußdiskussion gliedert sich in zwei Abschnitte:

1. Es wird eine zusammenfassende Diskussion der Resultate aller drei Ergebnisteile sowie der angewendeten Methoden vorgenommen. Soweit erforderlich werden dabei Literaturdaten zur Interpretation der Resultate herangezogen. Auf diese Weise lassen sich Aussagen über Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich, unterschiedliche Konformationen der Subpartikel in Abhängigkeit von dissoziiertem und reassoziertem Zustand, die Form der ribosomalen Proteine in situ sowie Proteinnachbarschaften und -verteilung im Ribosom treffen.

2. Die Ergebnisse anderer Autoren zur Topographie der Proteine im Ribosom werden mit den Daten der Vernetzungsexperimente und immunelektronenoptischen Versuche diskutiert.

### 1. Der Beitrag der drei angewendeten Versuchsmethoden zur Aufklärung der Ribosomenstruktur

#### 1.1. Aussagen über Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich und unterschiedliche Konformationen der Subpartikel in Abhängigkeit von dissoziiertem und reassoziertem Zustand

Der in Abschnitt 1.2.6.2. angestellte Vergleich über die Proteinzugänglichkeit in isolierten ribosomalen Untereinheiten und undissoziierten 70S Ribosomen erlaubte nur für Protein L19 eine Aussage über seine Position im Untereinheiten-Grenzbereich des 70S Ribosoms; allein dieses Protein ist im 70S Ribosom völlig unzugänglich für Antikörper, in seiner entsprechenden Untereinheit jedoch in starkem Maße erreichbar. Die ursprünglich zugrunde gelegte Prämisse, als Komponenten des Grenzbereiches auch diejenigen Proteine anzusehen, die in 70S Ribosomen für Antikörper nur partiell vermindert zugänglich sind, erwies sich als unzureichend. Bereits aus frühen physikochemischen Untersuchungen - wie Bestimmung des Tritium-Wasserstoff-Austausches zwischen Ribosomen und Lösungsmittel und "Solvent Perturbation"-Studien - konnte geschlossen werden, daß die Subpartikel in dissoziiertem Zustand (d.h. als isolierte Partikel) und reassoziertem Zustand (d.h. als Bestandteil von 70S Ribosomen) unterschiedliche Konformationen besitzen (Sherman und Simpson, 1969; Cotter und Gratzer, 1971). In der Folge wurden Konformationsunterschiede sowohl mittels chemischer

Modifikation von Proteinen in freien Untereinheiten und undissoziierten 70S Ribosomen gefunden (Tabellen 27a u. b, für Referenzen s. ebenda; s. auch Abschnitt I.3.5.3.), als auch mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Antikörperbindungsstudien nachgewiesen (s. Abschnitt I.2.6.2., Tabellen 15-17 sowie als Übersicht Tabellen 27a u. b); es zeigte sich, daß einige Proteine in 70S Ribosomen in stärkerem Maße an der Oberfläche erreichbar sind als in isolierten Untereinheiten. Für diejenigen Proteine, deren Antikörper nun bei der Reaktion mit 70S Ribosomen eine geringere Proteinzugänglichkeit als mit Subpartikeln erkennen lassen (s. Tabelle 17), kann folglich nicht unterschieden werden, ob dieser Effekt auf der Proteinanordnung im Grenzbereich oder auf veränderten Untereinheitenkonformationen beruht. Deshalb sind zur Bewertung dieser Ergebnisse Daten anderer Versuche heranzuziehen.

#### a. Reassoziaton von 30S und 50S Untereinheiten zu 70S Ribosomen in Gegenwart proteinspezifischer Antikörper

Das Prinzip dieser Versuche ist, daß Ribosomen, die bei niedriger  $Mg^{++}$ -Konzentration in Untereinheiten dissoziiert sind, mit monovalenten Fabs proteinspezifischer IgG-Antikörper vorinkubiert werden und nach anschließender Erhöhung der  $Mg^{++}$ -Konzentration der Grad der Reassoziaton zu 70S Partikeln bestimmt wird. In anderen Untersuchungen werden isolierte Untereinheiten mit Antikörpern inkubiert und erst danach die jeweils komplementären Subpartikel zugegeben. Der Nachweis der Reassoziaton erfolgt entweder in Sedimentationsuntersuchungen oder Funktionsexperimenten, in denen ribosomale Aktivitäten nur durch undissoziierte 70S Ribosomen geleistet werden können oder zumindest deutlich stimuliert werden. Die durch ein Fab hervorgerufene Hemmung der Reassoziaton läßt sich mit einiger Sicherheit auf die Position des entsprechenden antigenen Proteins im Untereinheiten-Grenzbereich bzw. dessen unmittelbarer Umgebung zurückführen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 27a und b zusammengefaßt.

#### Sedimentationsanalyse von reassozierten 70S Ribosomen

Mittels analytischer Ultrazentrifugation oder Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation wurde gezeigt, daß die Blockierung jeweils eines von fünf 30S-Proteinen (S9, S11, S12, S14, S20) und neun 50S-Proteinen (L1, L6, L14, L15, L19, L20, L23, L26, L27) durch entsprechende Antikörper die Reassoziaton völlig oder teilweise verhindert (Morrison et al., 1973; Highland et al., 1974a).



### Funktionsanalyse von reassozierten 70S Ribosomen

Die Untersuchung der EF-G-abhängigen GTP-Hydrolyse ergab, daß diese Aktivität durch Anti-S9, -S11, -L14, -L19, -L23 und -L27 nur dann inhibiert wird, wenn isolierte Untereinheiten mit einem dieser Antikörper vorbehandelt und dann mit den komplementären Subpartikeln unter hoher  $Mg^{++}$ -Konzentration inkubiert werden. Keine oder nur geringe Inhibition der Hydrolyse tritt bei der Untersuchung undissoziierter 70S Ribosomen auf (Highland et al., 1974a).

Antikörper gegen sieben Einzelproteine (S3, S8, S9, S11, S21, L14, L23) verhindern die EF-Tu-abhängige Phe-tRNA-Anlagerung an das Ribosom bei der Inkubation mit dissoziierten Ribosomen. Wesentlich schwächere Effekte werden dagegen mit undissoziierten 70S Partikeln beobachtet (Maschler, 1973; Lelong et al., 1974; Highland et al., 1974b).

Die RF-bedingte Termination der Peptidkettensynthese wird durch Antikörper gegen sechzehn Proteine ausschließlich beim Test dissoziiert vorliegender Ribosomen gehemmt (Tate et al., 1975). Es wurde gefolgert, daß die Termination durch Anti-S9 und -S11 eindeutig auf dem Niveau der 30S-50S-Anlagerung verhindert wird. Bei den Effekten von Anti-S2, -S3, -L2, -L4, -L6, -L11, -L14, -L15, -L17, -L18, -L20, -L23, -L26 und -L27 war dagegen nicht zu unterscheiden, ob die Blockierung der Terminationsreaktion auf die Beeinflussung der Reassoziaton und/oder der korrekten tRNA-Anlagerung an das Ribosom zurückzuführen ist.

Zu den Funktionsstudien sind ebenfalls die Untersuchungen über die Hydrolysierbarkeit nichtenzymatisch (d.h. faktorenunabhängig) an das Ribosom gebundener Phe-tRNA durch RNase zu zählen (Lütgehaus und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse; s. Stöffler, 1974). Bei diesen Experimenten wurde der Effekt ausgenutzt, daß die Aminoacyl-esterbindung von Phe-tRNA nur dann gegen RNase geschützt ist, wenn die tRNA an undissoziierten 70S Ribosomen gebunden ist. An freien Untereinheiten angelagerte tRNA wird hydrolysiert (Pestka, 1968). Stöffler und Mitarbeiter behandelten isolierte 30S oder 50S Untereinheiten mit Fabs gegen Einzelproteine, gaben die jeweils fehlende Untereinheit dazu und inkubierten im Aminoacylrest radioaktiv markierte Phe-tRNA mit dem Reaktionsgemisch. Eine Teilmenge jedes einzelnen Testansatzes wurde mit RNase behandelt und anschließend der Anteil der am Ribosom verbleibenden markierten tRNA gemessen. Für die andere Teilmenge ermittelte man die am Ribosom angelagerte tRNA direkt. Durch diesen Versuchsaufbau

ließ sich bestimmen, daß durch die Gegenwart von Antikörpern bedingte Hydrolyseeffekte auf der Verhinderung der Reassoziaton zu 70S Ribosomen beruhen und nicht auf eine mögliche Hemmung der tRNS-Bindung zurückzuführen sind. Antikörper gegen sieben 30S-Proteine (S9, S10, S11, S12, S14, S20 und S21) und dreizehn 50S-Proteine ((L1), L2, L6, L10, L11, L14, L15, L16, L19, L20, L23, L26 und L27) verhindern den Schutz gegen RNase-Verdauung (Lütgehaus und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, daß die entsprechenden antigenen Proteine im Untereinheiten-Grenzbereich vorliegen.

#### b. Immunologischer Nachweis von 30S-Proteinen in der 50S Untereinheit

Unterstützende Befunde über die Anordnung von 30S-Proteinen im Grenzbereich wurden durch Antikörperbindungsexperimente mit dissoziierten Ribosomen erbracht (s. Abschnitt I.2.5.). Es konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen die Proteine S9, S11, S12, S14, S16, S19, S20 und S21 sowohl mit 30S als auch mit 50S Untereinheiten reagieren (s. Tabelle 9). Nur der Effekt von Anti-S20 ist zu erwarten gewesen, weil S20 bekanntlich mit dem 50S-Protein L26 identisch ist (Wittmann et al., 1974; Tischendorf, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch für die übrigen Proteine ließ sich folgern, daß sie in beiden Subpartikeln vorkommen. Diese sollten in der 50S Untereinheit jedoch nur in geringen Mengen auftreten, weil sie in dieser Subpartikel mit anderen weniger sensitiven Methoden nicht nachzuweisen sind (s. z.B. Wittmann, 1974).

Man kann davon ausgehen, daß S9, S11, S12, S14, S16 und S21 als Komponenten des Grenzbereiches bei der Dissoziation der 70S Ribosomen auf beide Subpartikel verteilt werden; sie sind bei wenigstens einer der zuvor behandelten immunologischen Untersuchungen und/oder einer der ersten drei im folgenden beschriebenen biochemischen Versuche als Grenzbereichsproteine ermittelt worden (Tabelle 27a).

#### c. Biochemische Untersuchungen

Einige ribosomale Proteine können mit der isolierten rNS der heterologen Untereinheit wechselwirken (Stöffler et al., 1971a; Morrison et al., 1973; Garrett et al., 1974; Tabelle 27a). S11 und S12 binden an 23S rRNS, L19 bindet an 16S rRNS. Möglicherweise erfolgt diese Wechselwirkung auch in intakten 70S Ribosomen. Man sollte annehmen, daß sie dann im Untereinheiten-Grenzbereich auftritt.

Rekonstitutionsstudien zeigten, daß die Anwesenheit von S5 und S9 in 30S Untereinheiten Voraussetzung zur 30S-50S-Anlagerung und schließlich zur EF-G-abhängigen GTP-Hydrolyse ist (Marsh und Parmeggiani, 1973; Tabelle 27a). Die Autoren folgerten daraus, daß dieser Effekt der beiden Proteine auf ihrer Lage im Grenzbereich beruht.

Vernetzungsexperimente mit Glutaraldehyd ergaben, daß Protein S16 in undissoziierten 70S Ribosomen mit einem noch nicht identifizierten 50S-Protein verknüpft wird (Sun et al., 1974b; s. Abschnitt II.3.2.e u. Tabelle 26e). Diese Nachbarschaft zwischen 30S- und 50S-Proteinen im 70S Ribosom ließ klar auf eine Organisation von S16 im Untereinheiten-Grenzbereich bzw. dessen Nähe schließen.

Parallel zu den bereits behandelten Untersuchungen über die Zugänglichkeit der Proteine in intakten Untereinheiten wurde von mehreren Arbeitsgruppen die nichtenzymatische und enzymatische chemische Modifikation als Methode zur Bestimmung von Grenzbereichsproteinen eingesetzt (Moore, 1971; Huang und Cantor, 1972; Chang, 1973; Hsiung und Cantor, 1973; Litman und Cantor, 1974; Litman et al., 1974; Michalski und Sells, 1975; Tabellen 27a u. b; s. auch Abschnitt I.3.5.3.). Isolierte Untereinheiten wurden im Vergleich zu undissoziierten 70S Ribosomen behandelt. Eine geringere Modifikationsrate bestimmter Proteine in 70S Ribosomen deutete ihre Organisation im Grenzbereich an. Diese Aussagen sind jedoch eingeschränkt, weil davon konformationsbedingt abweichende Reaktivitäten der Untereinheiten in dissoziiertem und reassoziertem Zustand nicht unterschieden werden können. Tabelle 27 zeigt darüber hinaus, daß die Ergebnisse der einzelnen Studien zum einen nicht generell übereinstimmen und zum anderen sich nur in wenigen Fällen mit den wesentlich zuverlässigeren Daten der Reassoziationsstudien decken. Deshalb bleiben die Ergebnisse dieser Experimente bei der folgenden Zusammenfassung unberücksichtigt.

#### d. "Sichere" Proteine des Untereinheiten-Grenzbereiches

Betrachten wir zusammenfassend die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die der immunologischen Untersuchungen anderer Autoren sowie - mit Ausnahme der Daten chemischer Modifikationsexperimente - die Resultate der zuvor aufgeführten biochemischen Versuche, so kann ein Protein, das mit wenigstens zwei Methoden als Komponente des Grenzbereiches nachgewiesen worden ist, als "sicheres" Protein dieser Region klassifiziert werden. Auf diese

Weise läßt sich mit einiger Sicherheit eine Fehlinterpretation vermeiden, die auf einer möglichen Limitation einer einzigen Technik beruhen könnte. Für Proteine, die in undissoziierten 70S Ribosomen in geringerem Maße für Antikörper zugänglich sind als in ihren entsprechenden freien Subpartikeln, wurde entschieden, daß ihre unterschiedliche Reaktivität mit großer Wahrscheinlichkeit auf ihre Organisation im Grenzbereich zurückzuführen ist, wenn mindestens noch eine andere Untersuchung ihre Beteiligung an diesem Bereich ergab.

Die Grenzbereichsproteine sind in vier Gruppen einzuteilen:

L19: Dieses Protein ist als einziges in 70S Ribosomen völlig unzugänglich für Antikörper - in isolierten Untereinheiten dagegen stark erreichbar - und konnte bei nahezu allen übrigen der berücksichtigten Studien als Protein des Grenzbereiches nachgewiesen werden (Tabelle 27b).

S12 und S16: Diese Proteine sind in 70S Ribosomen wenn auch nicht völlig unzugänglich, so doch in geringerem Maße erreichbar als in isolierten 30S Untereinheiten. Beide Proteine ließen sich weiterhin bei mindestens zwei anderen Untersuchungen als Grenzbereichsproteine bestimmen (Tabelle 27a; s. auch den vorhergehenden Punkt c.).

S9, S11, S14, S20, S21, (L11,) L14, L23 und L27: Auch die Anordnung dieser Proteine im Grenzbereich ist als abgesichert zu werten. Sie sind zwar in 70S Ribosomen unvermindert erreichbar, haben aber (außer L11) bei wenigstens drei Untersuchungen eindeutigen Einfluß auf den Grenzbereich gezeigt (Tabellen 27a u. b). S20 wird zu dieser Gruppe gerechnet, obwohl Anti-S20 mit 70S Ribosomen stärker reagiert als mit 30S Untereinheiten. Wie bereits ausgeführt, dürfte dieser Effekt auf der Identität von S20 mit L26 in der 50S Untereinheit beruhen (Wittmann et al., 1974; Tischendorf, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse). An dieser Stelle sei auch schon L11 aufgeführt. Dieses Protein ist nur bei einer der berücksichtigten Untersuchungen ermittelt worden, wurde aber mit einer von zwei Antikörperbindungsstellen in unmittelbarer Nähe der Proteine L14, L19, L23 und L27 auf der 50S Untereinheit elektronenoptisch lokalisiert (s. Abb. 44; Tischendorf und Stöffler, 1975; Tischendorf et al., 1975). Wie im folgenden Punkt e. ausgeführt wird, konnte der Ort mit diesen Proteinen nach elektronenmikroskopischen Studien als Teil des Untereinheiten-Grenzbereiches bestimmt werden.

S10, L1, L2, L6, L15, L20 und L26: Die Anordnung dieser Proteine im

Grenzbereich ist nicht in dem Maße abgesichert wie für die zuvor aufgeführten Proteine. Wohl haben zwei Methoden zum Nachweis dieser Proteine geführt (Tabellen 27a u. b), jedoch sind die Effekte der entsprechenden Antikörper im allgemeinen lediglich schwach gewesen. S10 ist dabei als einziges Protein in 70S Ribosomen vermindert reaktiv.

Für diejenigen Proteine, die einzig bei den Antikörperbindungsexperimenten mit undissoziierten 70S Ribosomen ermittelt wurden (S2, S4, S13, S18, L8, L25, L29, L31; Tabellen 27a u. b), ist folglich ihre Anordnung im Grenzbereich fraglich. Wahrscheinlicher sollte sein, daß ihre verminderte Zugänglichkeit in 70S Ribosomen im Vergleich zu isolierten Untereinheiten durch verschiedene Konformationen der Subpartikel in dissoziiertem und reassoziiertem Zustand bedingt ist.

Es stellt sich die Frage, warum die Antikörperbindungsexperimente mit undissoziierten 70S Ribosomen und die Reassoziationsversuche in Gegenwart von Antikörpern nicht mehr Übereinstimmungen zeigen, als aus Tabelle 27 zu ersehen ist. Das sollte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß in mehreren Fällen Antikörper aus verschiedenen Tieren verwendet wurden und somit individualspezifische Unterschiede zum Tragen kommen könnten. Die Reassoziationsstudien - bei denen für den Vorgang der Antikörperbindung im übrigen dieselben Eigenschaften und Limitationen zugrunde liegen, wie bereits in Abschnitt 1.3.1. ausgeführt - setzen voraus, daß freie Untereinheiten anstatt 70S Ribosomen mit Immunglobulinen inkubiert wurden. Aufgrund unterschiedlicher Subpartikelkonformationen wären deshalb abweichende Muster zugänglicher Determinanten möglich. Darüber hinaus ist in Betracht zu ziehen, daß mehrere Proteine im Ribosom elongiert sind (s. den folgenden Abschnitt 1.2.). Falls das auch für die Grenzbereichsproteine zuträfe, könnten sie unter Umständen nur mit Teilen ihrer Molekülkörper in dieser Region vorkommen. Es wäre beispielsweise denkbar, daß ein gestrecktes Protein mit mehreren zugänglichen Determinanten nur eine davon im Grenzbereich aufweist. Bei den Reassoziationsversuchen würde die Blockierung dieser einen Erkennungsstelle durch einen Antikörper ausreichen, die 30S-50S-Anlagerung zu verhindern, während Immunglobuline gegen die übrigen Determinanten mit undissoziierten 70S Partikeln Ribosomen-Antikörper-Komplexe bilden dürften.



Schließlich ist folgende Eigenschaft der Reassoziations-technik zu beachten: Fabs gegen Proteine außerhalb des Grenzbereiches könnten die Reassozi-ation hemmen, indem die Immunglobuline mit ihrem vom Antigenbindungs-bereich distalen Abschnitt in diese Region reichen. Auch dann sollte die Antikörper-bindungsstelle im allgemeinen noch in der Nähe des Grenzbereiches liegen, denn nur im Extremfall kann der Abstand zwischen Bindungsstelle und Grenz-bereich so groß sein, wie das Fab an seiner längsten Stelle mißt (70-80Å).

#### e. Vergleich mit den Ergebnissen der Vernetzungsexperimente und immu- nelektronenoptischen Versuche

Experimente mit bifunktionellen Reagenzien erbrachten mit dem Proteinpaar S16-LX bereits Hinweise auf Proteinnachbarschaften zwischen der 30S und 50S Untereinheit im Grenzbereich (s. Tabelle 26e), ließen hingegen noch keine Aussagen über benachbarte Grenzbereichsproteine in einer Subpartikel zu; es wurden bisher noch keine Komplexe mit zwei 30S- oder 50S-Proteinen dieses Bereiches nachgewiesen (s. Tabelle 26a-d).

Weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchungen an undissoziierten 70S Ribosomen und 70S-IgG-70S-Komplexen erlaubten, den Untereinheiten-Grenz-bereich Strukturmerkmalen des Ribosoms zuzuordnen. Es ließ sich klar zeigen, daß in 70S Ribosomen die 30S Subpartikel mit der "Sitzregion" der 50S Unter-einheit in Wechselwirkung tritt (Tischendorf et al., 1975; Abb. 45). Die

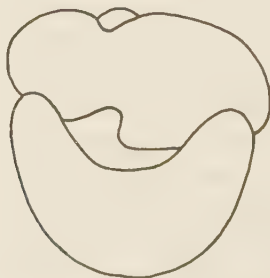


Abb. 45. Elektronenoptisch nachgewiesene Form des 70S Ribosoms  
Für Einzelheiten s. Text. (aus Tischendorf et al., 1975)



30S Subpartikel liegt waagrecht im "Sitz" - transversal zur mittleren Protuberanz der 50S Untereinheit - und weist mit ihrem "Kopf" zur rechten und ihrem "Körper" zur linken Protuberanz.<sup>\*)</sup> Die auf der Frontansicht isolierter 30S Untereinheiten sichtbare Grube ist in 70S Ribosomen zum "50S-Sitz" und zur mittleren Protuberanz gewandt. Der "50S-Sitz" und große Teile der 30S-Frontansicht bilden somit den Untereinheiten-Grenzbereich. Es zeigt sich, daß die beiden Subpartikel im Grenzbereich nicht durchweg in direktem Kontakt miteinander sein können. Direkten Kontakt hat danach die 50S Untereinheit nur mit dem "Kopf" bzw. dem "Körper" der 30S Untereinheit, während die Grube der 30S Untereinheit mit dem gewölbten "Sitz" der 50S Partikel einen Tunnel formt. Dieser Schluß ist in Einklang damit, daß im 70S Ribosom die dem "Tunneleingang" entsprechende Region meistens stark kontrastiert ist (Tischendorf et al., 1975).

In ausgezeichneter Übereinstimmung mit dem 70S-Modell ist, daß direkt im gewölbten "Sitz" der 50S Untereinheit Antikörperbindungsstelle der fünf "sicheren" Grenzbereichsproteine L11, L14, L19, L23 und L27 lokalisiert wurden (s. den vorhergehenden Punkt d. und Abb. 44). Auf das 70S Ribosom bezogen, befinden sich die Bindungsstellen im Tunnel (Abb. 45). Anhand dieses Modells ist die unterschiedliche Reaktivität dieser Proteine bei den einzelnen immunologischen Grenzbereichsstudien zu verstehen:

Die ausbleibende Reaktion von Anti-L19 mit dem 70S Ribosom besagt, daß L19 im Tunnel vollkommen unzugänglich ist. Die lediglich partiell verminderte Erreichbarkeit von L14 und L23<sup>++)</sup> in der 70S Partikel, verglichen mit freien 50S Untereinheiten, ist dagegen auf zweifache Weise zu erklären: 1. Die Bindungsstelle für Anti-L14 und -L23 sind - anders als die für Anti-L19 - im Tunnel noch relativ exponiert, so daß die Antikörper mit dem 70S Ribosom zwar nur reduziert, aber doch eindeutig reagieren können. Obwohl dies auf die im "50S-Sitz" etwas zur "Sitzkante" vorgelagerte Orientierung von

---

<sup>\*)</sup> Lake et al. (1974b) beschrieben ein Modell für das 70S Ribosom, das mit dem hier vorgestellten nicht übereinstimmt. Danach liegt die 30S Untereinheit - bezogen auf Abbildung 45 - um 90° gedreht auf der 50S Untereinheit, und zwar mit dem "Kopf" zur mittleren Protuberanz gerichtet.

<sup>++)</sup> Der Effekt von Anti-L27 wird nicht berücksichtigt; s. dazu die Legende zu Tabelle 17.

L14 und L23 zurückzuführen sein könnte, dürfte diese Erklärung nur bedingt zutreffen. Voraussetzung für diese Reaktionen wäre nämlich, daß der Tunnel groß genug ist, damit ein IgG mit einem seiner Fab-Arme in den Tunnel hineindiffundieren kann. Darüber hinaus müßte auch noch der Freiheitsgrad des gebundenen IgGs unbeeinflußt bleiben, so daß der andere Fab-Arm ein zweites 70S Ribosom an der gleichen Stelle bindet und es somit zur beobachteten Dimerbildung kommt. 2. Für die Reaktivität von L14 und L23 im 70S Ribosom ist deshalb wahrscheinlicher, daß aufgrund unterschiedlicher Subpartikelkonformationen andere Determinanten erkannt werden als in der isolierten 50S Untereinheit.

L11 hat nicht nur wie L14, L19, L23 und L27 eine einzige Antikörperbindungsstelle im "50S-Sitz", sondern zusätzlich eine an der "Sitzkante" (s. Abb. 44; Tischendorf und Stöffler, 1975; Tischendorf et al., 1975). Dieser zweite Bindungsort, der bei Berücksichtigung des 70S-Modells nur der Umgebung des Grenzbereiches zuzuordnen ist (s. Abb. 44 u. 45), dürfte sowohl bei den Antikörperbindungsstudien mit 70S Ribosomen und freien 50S Untereinheiten als auch bei den Reassoziationsexperimenten durch Antikörper erkannt werden. Das macht die gleichstarke Erreichbarkeit dieses Grenzbereichsproteins in Ribosom und Untereinheit erklärlich und läßt außerdem den Effekt auf die 30S-50S-Anlagerung verstehen, die - anders als durch Anti-L14, -L19, -L23 und -L27 - durch Anti-L11 lediglich bei einem der Reassoziationsexperimente gehemmt wird (Tabelle 27b).

Die in Abbildung 43 angegebenen Proteinpositionen auf der 30S Untereinheit reichen nicht aus, um eine vergleichbare Diskussion mit den Resultaten über Grenzbereichsproteine vorzunehmen wie für die zuvor behandelten 50S-Proteine. Es fehlen vor allem die Ortsangaben für die Proteine S9 und S20. Außerdem liegen die verzeichneten Antikörperbindungsstellen von S11, S12 und S14 nicht direkt auf dem Teil der 30S-Frontansicht (s. Abb. 43), der im 70S Ribosom durch die 50S Subpartikel abgedeckt wird (Abb. 45). Die drei Proteine haben ihre Bindungsstellen jedoch in unmittelbarer Nähe dieser 30S-Region. In weiterführenden Untersuchungen ließen sich zusätzliche Bindungsorte der bereits lokalisierten Grenzbereichsproteine sowie die Orte weiterer Proteine bestimmen (Tischendorf et al., 1975). Dabei ergab die Interpretation der Ortsangaben anhand des 70S-Modells eine gute Übereinstimmung mit den im vorhergehenden Punkt d. klassifizierten 30S-Grenzbereichsproteinen.

Legende zu Tabelle 27:

- a s. Abschnitt I.2.6. dieser Arbeit und Tabelle 17
- aa s. Abschnitt III.2.3.2. dieser Arbeit und Abb. 44
- b s. Abschnitt I.2.5. dieser Arbeit und Tabelle 9
- c Morrison et al., 1973  
Analyt. UZ. = Analytische Ultrazentrifugation
- d Highland et al., 1974a  
Dichtegrad. Zentrifug. = Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation  
EF-G GTPase = EF-G-abhängige GTPase-Aktivität
- e Highland et al., 1974b  
enz. Bind. Phe-tRNS = EF-Tu-abhängige Phe-tRNS-Bindung
- f Lelong et al., 1974  
enz. Bind. Phe-tRNS = siehe Ref. e
- g Lütgehaus und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse; s. Stöffler, 1974  
n.enz. Phe-tRNS Bind./RNase Sensitiv. = RNase-Sensitivität nichtenzymatisch gebundener Phe-tRNS
- h Tate et al., 1975
- i Morrison et al., 1973; Stöffler et al., 1971a; Garrett et al., 1974
- j Marsh und Parmeggiani, 1973
- k Moore, 1971  
NEM = N-Äthylmaleinimid
- l Chang, 1973  
NEM = siehe Ref. k
- m Huang und Cantor, 1972  
FITC = Fluorescein Isothiocyanat
- n Litman et al., 1974  
enz. Jod. = enzymatische Jodierung  
(<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Miller und Sypherd, 1973b)
- o Hsiung und Cantor, 1973  
FITC = siehe Ref. m
- p Litman und Cantor, 1974  
enz. Jod. = siehe Ref. n
- q Michalski und Sells, 1975  
enz. Jod. = siehe Ref. n

UE = Untereinheit

& S6 und L12 nicht aufgelöst

&& S20 und L26 nicht aufgelöst

- + Das Protein ist in undissoziierten 70S Ribosomen weniger zugänglich als in isolierten Untereinheiten (Ref. a, k-q) oder sein entsprechender Antikörper verhindert die Reassoziaton von 30S und 50S Untereinheiten zu 70S Ribosomen (Ref. c-h). Bei verminderter Proteinerreichbarkeit in 70S Ribosomen läßt sich nicht von vornherein unterscheiden, ob dadurch die Orientierung des Proteins im Untereinheiten-Grenzbereich oder Konformationsunterschiede der Subpartikel in dissoziiertem und reassoziertem Zustand widerspiegelt werden (für Einzelheiten s. Text). Die Reassoziationsversuche geben mit einiger Sicherheit die Proteinanordnung im Grenzbereich an. (+++, ++, +, ± graduelle Abstufung, wie von den Autoren angegeben.)
- +§ Das Protein ist in undissoziierten 70S Ribosomen weniger erreichbar als in isolierten Untereinheiten (Ref. a); unter Berücksichtigung anderer Ergebnisse ist dieser Effekt wahrscheinlich nicht auf eine Proteinanordnung im Grenzbereich, sondern auf Konformationsänderungen der Untereinheiten zurückzuführen (für Einzelheiten s. Text).
- § Das Protein ist in isolierten Untereinheiten weniger erreichbar als in 70S Ribosomen; dieser Effekt läßt auf Konformationsänderungen der Untereinheiten schließen (für Einzelheiten s. Text). Das Ergebnis für Protein S20 könnte auf seiner Identität mit dem 50S-Protein L26 beruhen (Wittmann et al., 1974; Tischendorf, Stöffler und Wittmann, unveröffentlichte Ergebnisse).
- Das Protein ist bei der jeweiligen Untersuchung nicht als Komponente des Grenzbereiches nachgewiesen worden.

kein Symbol: Für das Protein liegt keine Information vor.

Unterstrichene Proteine können als "sichere" Grenzbereichsproteine klassifiziert werden.

Fortsetzung: Tabelle 27 a.

| Protein | Chemische Modifikation |                         |                   |                           |                           |
|---------|------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
|         | NEM <sup>k</sup>       | NEM <sup>l</sup>        | FITC <sup>m</sup> | enz. <sup>n</sup><br>Jod. | enz. <sup>q</sup><br>Jod. |
| S1      | -                      | -                       | -                 | -                         | -                         |
| S2      | -                      | -                       | -                 | -                         | -                         |
| S3      | -                      | -                       | -                 | §                         | -                         |
| S4      | §                      | ++                      | -                 | -                         | §                         |
| S5      | -                      | +                       | +++               | -                         | -                         |
| S6      | -                      | + <sub>&amp;</sub>      | -                 | §                         | §                         |
| S7      | -                      | -                       | -                 | -                         | ++                        |
| S8      | -                      | -                       | +                 | -                         | -                         |
| S9      | -                      | +++                     | ++                | §                         | -                         |
| S10     | -                      | -                       | -                 | +                         | -                         |
| S11     | +                      | ++                      | -                 | -                         | +++                       |
| S12     | -                      | +                       | +++               | + <sub>%</sub>            | +++                       |
| S13     | -                      | ++                      | ++                | -                         | -                         |
| S14     | -                      | +++                     | +++               | -                         | -                         |
| S15     | -                      | ++                      | +                 | -                         | -                         |
| S16     | -                      | +                       | )                 | -                         | -                         |
| S17     | §                      | -                       | )                 | -                         | -                         |
| S18     | §                      | +                       | ++                | §                         | -                         |
| S19     | -                      | +                       | +++               | -                         | §                         |
| S20     | -                      | + <sub>&amp;&amp;</sub> | +                 | -                         | §                         |
| S21     | §                      | -                       | §                 | -                         | -                         |





Tabelle 27 b. 50S-Proteine

| Protein    | Unzugäng- <sup>a</sup><br>lichkeit<br>in 70S | El.Mi. <sup>aa</sup><br>Lokali-<br>sierung | Immunologische Untersuchungen     |                                        |                             |          |
|------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------|----------|
|            |                                              |                                            | Inhibition der Reassoziaton durch |                                        | Funktionsana                |          |
|            |                                              |                                            | Sedimentationsanalyse             |                                        | enz.Bind.                   |          |
|            |                                              |                                            | Analyt. <sup>c</sup><br>UZ        | Dichtegrad. <sup>d</sup><br>Zentrifug. | EF-G <sup>d</sup><br>GTPase | Phe-tRNS |
| <u>L1</u>  | -                                            |                                            | +                                 |                                        |                             |          |
| <u>L2</u>  | +                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L3</u>  | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L4</u>  | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L5</u>  | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L6</u>  | -                                            |                                            | ++                                |                                        |                             |          |
| <u>L7</u>  | §                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L8</u>  | +§                                           |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L9</u>  | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L10</u> | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L11</u> | -                                            | L11                                        | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L12</u> | §                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L13</u> | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L14</u> | -                                            | L14                                        | +                                 | ++                                     | ++                          | +        |
| <u>L15</u> | -                                            |                                            | +                                 | -                                      | -                           |          |
| <u>L16</u> | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L17</u> | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L18</u> | §                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L19</u> | +++                                          | L19                                        | +++                               | +++                                    | +++                         |          |
| <u>L20</u> | -                                            |                                            | ++                                |                                        |                             |          |
| <u>L21</u> |                                              |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L22</u> | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L23</u> | -                                            | L23                                        | +++                               | ++                                     | ++                          | +        |
| <u>L24</u> | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L25</u> | +§                                           |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L26</u> | -                                            |                                            | +                                 |                                        |                             |          |
| <u>L27</u> |                                              | L27                                        | ++                                | ++                                     | ++                          |          |
| <u>L28</u> | §                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L29</u> | +§                                           |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L30</u> | §                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L31</u> | +§                                           |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L32</u> | -                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L33</u> | §                                            |                                            | -                                 |                                        |                             |          |
| <u>L34</u> | §                                            |                                            |                                   |                                        |                             |          |

|                            | Prot.Bind. <sup>i</sup> | Chemische Modifikation |                   |                           |                           | Protein |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| Tab                        | an RNS d.               |                        |                   |                           |                           |         |
| se                         | heterol.UE              | NEM <sup>l</sup>       | FITC <sup>o</sup> | enz. <sup>p</sup><br>Jod. | enz. <sup>q</sup><br>Jod. |         |
| n.enz.Bind. <sup>g</sup>   |                         |                        |                   |                           |                           |         |
| Phe-tRNS/<br>RNase Sensit. |                         |                        |                   |                           |                           |         |
| +                          | -                       | -                      | -                 |                           | -                         | L1      |
| ++                         | -                       | ++                     | -                 | +++                       | +++                       | L2      |
| -                          | -                       | -                      | -                 | -                         | §                         | L3      |
| -                          | -                       | +                      | -                 |                           | -                         | L4      |
| -                          | -                       | -                      |                   |                           | -                         | L5      |
| +                          | -                       | +                      |                   | -                         | -                         | L6      |
| -                          | -                       | -                      | -                 |                           |                           | L7      |
| -                          | -                       | -                      | -                 | ) §                       | -                         | L8      |
| -                          | -                       | -                      | -                 |                           | -                         | L9      |
| ++                         | -                       | -                      |                   | §                         | -                         | L10     |
| ++                         | -                       | -                      |                   | §                         | +++                       | L11     |
| -                          | -                       | + <sub>2</sub>         | -                 |                           |                           | L12     |
| -                          | -                       | ++                     |                   | +                         | -                         | L13     |
| +                          | -                       | +                      |                   | -                         | -                         | L14     |
| +                          | -                       | ++                     |                   | -                         | -                         | L15     |
| +                          | -                       | ++                     |                   |                           | -                         | L16     |
| -                          | -                       | +++                    |                   | -                         | §                         | L17     |
| -                          | -                       | +                      |                   | +                         | -                         | L18     |
| +                          | 16S RNS                 | ++                     | -                 |                           | -                         | L19     |
| ++                         | -                       | +++                    | -                 |                           |                           | L20     |
| -                          | -                       | -                      | -                 |                           | -                         | L21     |
| -                          | -                       | +                      |                   |                           | -                         | L22     |
| ++                         | -                       | ±                      | -                 |                           | -                         | L23     |
| -                          | -                       | ++                     |                   |                           | -                         | L24     |
| -                          | -                       | ±                      |                   |                           | -                         | L25     |
| +                          | -                       | + <sub>2&amp;2</sub>   | -                 | +++                       | +++                       | L26     |
| ++                         | -                       | +                      |                   | +                         |                           | L27     |
| -                          | -                       | +                      | -                 | ++                        | +++                       | L28     |
| -                          | -                       | +                      |                   |                           | -                         | L29     |
| -                          | -                       | -                      |                   |                           | -                         | L30     |
| -                          | -                       |                        | -                 |                           |                           | L31     |
| -                          | -                       | -                      | -                 | -                         | -                         | L32     |
| -                          | -                       | -                      | -                 |                           | -                         | L33     |
| -                          | -                       |                        |                   |                           |                           | L34     |

## 1.2. Aussagen über die Form der Proteine innerhalb des Ribosoms

Im Verlauf der Arbeit wurde bereits wiederholt angedeutet, daß aufgrund verschiedener immunologischer Resultate mehrere Proteine im Ribosom nicht globulär, sondern elongiert sein sollten. Da dies hier ausführlich besprochen wird, sind noch einmal folgende räumliche Bedingungen zu vergegenwärtigen:

1. Der Fab-Arm eines IgG-Antikörpers hat Dimensionen von  $70\text{-}80\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 40\text{\AA}$  (Davies et al., 1971; Sarma et al., 1971; Poljak et al., 1973). Der Antigenbindungsbereich an der Schmalseite des Fab-Moleküls mißt je nach Haptenspezifität des Antikörpers  $15\text{-}36\text{\AA} \times 6\text{-}17\text{\AA} \times 6\text{-}12\text{\AA}$  (Kabat, 1966; Amzel et al., 1974; Segal et al., 1974).

2. Antigene Determinanten eines Proteins bestehen aus wenigstens 4-6 Aminosäureresten und sollten demnach zumindest  $27\text{-}36\text{\AA} \times 10\text{-}17\text{\AA} \times 6\text{-}7\text{\AA}$  groß sein (zur Übersicht s. z.B. Kabat, 1966; Sela, 1969).

3. Nimmt man an, daß die ribosomalen Proteine mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ca. 20000 Dalton als globuläre Moleküle vorliegen, sollten sie einen Durchmesser von ca.  $30\text{\AA}$  aufweisen (Kurland, 1974a).

Die Antikörperbindungsversuche mit isolierten Untereinheiten ergaben, daß IgGs gegen 17 30S-Proteine und 16 50S-Proteine zur Bildung hochvernetzter Untereinheiten-IgG-Aggregate führen (s. Tabelle 8). Da Aggregation offensichtlich die Reaktion mit mehr als einer antigenen Determinante voraussetzt und von den entsprechenden Proteinen bis auf drei jedes mit maximal nur 1 Kopie/Untereinheit vorliegt (s. Tabellen 19 u. 20), kann gefolgert werden, daß diese Proteine mindestens zwei Determinanten an der Partikeloberfläche erreichbar haben. Geht man davon aus, daß die Proteine innerhalb des Ribosoms globulär sind, ist aufgrund der Abmessungen des Fabs einerseits und des Proteindurchmessers andererseits eine gleichzeitige Bindung von wenigstens zwei Antikörpern nur unter folgender Bedingung vorstellbar: Die Proteine müßten an sich verzweigenden Stellen der Untereinheit vorkommen, so daß sie an gegenüberliegenden Seiten der Subpartikel erreicht werden können. Dieser Sonderfall sollte nur für solche Proteine zutreffen, die sich an einer Einschnürung der Partikel oder einem der Pole befinden.

Plausibler - nicht zuletzt wegen der großen Anzahl aggregatebildender Antikörper - erscheint deshalb die Erklärung, daß die meisten der entsprechenden Proteine im Ribosom gestreckt sind und dadurch zwei oder mehr voneinander ausreichend entfernte Determinanten besitzen (s. Tabelle 18). Auf diese Weise lassen sich auch die bei den Sedimentationsstudien mit der analytischen Ultrazentrifuge sowie den Immunodoppeldiffusionsversuchen beobachteten Aggregations- bzw. Präzipitationseffekte erklären (Stöffler et al., 1973;

Morrison, 1974; Morrison, Tischendorf, Stöffler und Garrett, unveröffentlichte Ergebnisse; Hasenbank und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse; s. auch Abschnitt I.3.5.1.a u. b).

Übereinstimmende Aussagen über die gestreckte Form einzelner ribosomaler Proteine in situ erbrachten die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen. Vier Proteine, deren Antikörper jeweils hochvernetzte Aggregate bilden, ließen sich mit wenigstens zwei Antikörperbindungsstellen auf der Ribosomenoberfläche nachweisen (S4, S5, S11, S12)<sup>\*)</sup> (Tabelle 28, s. auch Tabelle 18 und Abb. 43 u. 44). Zwei Antikörperansatzstellen wurden auch für Anti-S6 und -L11 bestimmt, jedoch aggregierten diese IgGs die Untereinheiten nicht (Tabelle 28). (Auf diesen Sachverhalt wird später gesondert eingegangen (s. S. 236)). Umrundet man bei jedem dieser Proteine seine Antikörperbindungsstellen derart, daß sich die kürzesten Verbindungen zwischen den Markierungspunkten ergeben (bei den Proteinen S4 und S5 mit drei Bindungsstellen in Reihenfolge ausgehend vom Kopf nach unten) (s. Abb. 43 u. 44) und setzt voraus, daß sich zwischen den einzelnen Bindungsstellen - möglicherweise im Ribosomeninneren - die Peptidkette des jeweiligen Proteins erstreckt, so ergeben sich im allgemeinen Bindungsabstände zwischen ca. 60 Å (S5) und 150 Å (S4). Nur die beiden Ansatzstellen für Anti-S6 liegen mit ca. 40 Å näher zusammen.

Die ermittelten Distanzen bedeuten nicht unbedingt, daß die erkannten antigenen Determinanten in den einzelnen Proteinen ebenso weit voneinander entfernt sind. Da ein Fab-Arm des IgG-Antikörpers größer als der tatsächliche Antigenbindungsbereich und die antigene Determinante ist, wäre es möglich, daß die Determinanten in der einen oder anderen Richtung von den Fabs überlappt werden. Der Abstand zwischen den Determinanten könnte demnach etwas größer oder kleiner sein als angegeben. Somit ist ein Durchmesser von ca. 30 Å für globuläre Proteine nur mit S6 vereinbar. Dagegen sollten die Proteine S4, S5, S11, S12 und L11 gestreckt sein, und zwar selbst dann, wenn die Ribosomenoberfläche uneben oder sogar etwas rissig wäre.

Der Einwand, daß die letztgenannten Proteine dennoch globulär sein könnten, wenn sie in verschiedenen Untereinheitenpopulationen an jeweils unterschiedlichen Positionen vorlägen, ist allein schon wegen der Aggregationsergebnisse

<sup>\*)</sup> L7/L12 und u.U. L18 haben höhere stöchiometrische Anteile als 1 Kopie/Untereinheit und bleiben deshalb hierbei unberücksichtigt. Weiteres s. Fußnote <sup>++)</sup> in der Legende zu Tabelle 28.

Tabelle 28. Ausgewählte Proteine - die Anzahl der elektronenoptisch bestimmten Antikörperbindungsstellen und die Bildung hochvernetzter Ribosomen-Antikörper-Aggregate durch homologe IgG-Antikörper

| Protein                | Anzahl der Antikörperbindungsstellen (Abb. 43 u. 44) | Bildung hochvernetzter Ribosomen-Antikörper-Aggregate (Tabelle 18) |
|------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| S4                     | 3 (4 <sup>+</sup> )                                  | ja                                                                 |
| S5                     | 3                                                    | ja                                                                 |
| S6                     | 2                                                    | nein                                                               |
| S11                    | 2                                                    | ja                                                                 |
| S12                    | 2                                                    | ja                                                                 |
| S13                    | 1                                                    | nein                                                               |
| S14                    | 1                                                    | ja                                                                 |
| S19                    | 1                                                    | ja                                                                 |
| L1                     | 1                                                    | ja                                                                 |
| L4                     | 1                                                    | ja                                                                 |
| L6                     | 1                                                    | ja                                                                 |
| L7/L12 <sup>++</sup> ) | 3                                                    | ja                                                                 |
| L11                    | 2                                                    | nein                                                               |
| L14                    | 1                                                    | ja                                                                 |
| L16                    | 1                                                    | ja                                                                 |
| L17                    | 1                                                    | - +++)                                                             |
| L18 <sup>++</sup> )    | 2                                                    | nein                                                               |
| L19                    | 1                                                    | ja                                                                 |
| L22                    | 1                                                    | - +++)                                                             |
| L23                    | 1                                                    | ja                                                                 |
| L27                    | 1                                                    | ja                                                                 |

<sup>+</sup>) Tischendorf et al., 1975; Tischendorf und Stöffler, 1975

<sup>++</sup>) L7/L12 kommen mit wenigstens 2 Kopien/50S Untereinheit vor. Für L18 ist der stöchiometrische Anteil (1 oder 2 Kopien) noch nicht endgültig geklärt. Alle übrigen Proteine sind mit nicht mehr als 1 Kopie/Untereinheit vertreten. Für Einzelheiten s. Abschnitt I.3.2. und Tabellen 19 und 20.

<sup>+++</sup>) Unfraktioniertes  $\gamma$ -Globulin anstatt IgG verwendet.

unwahrscheinlich. Hinzu kommt, daß sich in allen untersuchten Dimeren der Antikörperansatzpunkt auf jeder der beiden Untereinheiten an jeweils dem gleichen Ort befindet. Mit Anti-S4 konnten sogar spezielle Dimere nachgewiesen werden, in denen die Untereinheiten gleichzeitig durch zwei IgGs vernetzt sind (Tischendorf et al., 1975).

Ein Abstand von  $150\text{\AA}$  zwischen den Bindungsstellen für Anti-S4 läßt den Schluß zu, daß S4 im Ribosom eine fibrilläre Struktur hat. Kürzlich konnte für S4 noch ein vierter Bindungsort auf dem "Kopf" der 30S Untereinheit lokalisiert werden, woraus sich eine maximale Distanz zwischen den Bindungsstellen von  $200\text{\AA}$  ergibt (Tischendorf et al., 1975; Tischendorf und Stöffler, 1975). S4 wurde ferner von Lake et al. (1974) immunoelektronenoptisch auf der 30S Subpartikel nachgewiesen. Von den drei ermittelten Antikörperansatzstellen stimmen zwei mit den in Abbildung 43 angegebenen überein. Der Bindungs-ortabstand liegt nach diesen Untersuchungen bei  $170\text{\AA}$ .

Derart große Abstände zwischen den Antikörperansatzstellen von S4 erscheinen nicht verwunderlich. Berücksichtigt man nämlich, daß S4 203 Aminosäuren hat (Schiltz und Reinbolt, 1975), und nimmt an, daß es völlig als  $\alpha$ -Helix vorliegt, könnte dieses Protein sogar bis zu  $300\text{\AA}$  lang sein (Stöffler und Tischendorf, 1975). Weiterhin zeigten hydrodynamische Untersuchungen und Röntgenkleinwinkel-Streuungsstudien an isolierten ribosomalen Proteinen (Wong und Paradies, 1974; Franz und Paradies, 1976; Paradies, persönliche Mitteilung), daß S4 als flexibler Stab mit einer Länge von  $140\text{\AA}$  ein Achsenverhältnis von 10:1 aufweist. Dieses Ergebnis läßt sich jedoch nicht zur direkten Unterstützung der immunoelektronenmikroskopischen Daten heranziehen, weil die Struktur eines isolierten Proteins nicht zwingend seiner Form im Ribosom entsprechen muß.

Auffällig ist, daß für mehrere Proteine die ermittelte Anzahl der Antikörperbindungsstellen nicht in Einklang mit den Aggregationsergebnissen ist (Tabelle 28). So zeigt sich, daß einige IgG-Antikörper mehr als einen Bindungsort markieren, hingegen keine Aggregate bilden. Da für die Bindungsstudien und die hier berücksichtigten elektronenoptischen Versuche generell IgGs desselben Tierursprungs verwendet wurden, läßt sich dieser Befund nicht mit individualspezifischen Unterschieden der Immunglobuline erklären. Vielmehr ist anzunehmen, daß in einigen Fällen die Ansatzstellen räumlich noch genügend auseinander liegen, um sie elektronenoptisch zu unterscheiden, zur gleichzeitigen Reaktion mit ihren Immunglobulinen aber doch zu eng benachbart sind (als typisches Beispiel s. S6). Es wäre auch vorstellbar, daß die



Determinanten zwar ausreichend voneinander entfernt vorkommen, so daß die Bindung mehrerer IgGs an eine einzige isolierte Untereinheit möglich erscheint; allerdings könnte nach erfolgter Dimerformation wegen der Orientierung der beiden Subpartikel die Bindung eines weiteren Antikörpers zusätzlich zum verknüpfenden verhindert sein.

Umgekehrt führt eine Anzahl von IgGs zu Aggregaten, läßt indessen bisher nur auf die Markierung jeweils einer Ansatzstelle schließen (Tabelle 28). Entweder sind die verschiedenen Bindungsorte in diesen Fällen auf den einzelnen Proteinen elektronenoptisch ununterscheidbar oder erlauben nicht alle gebildeten Dimere die Lokalisation der Bindungsstellen; an bestimmten Oberflächenstrukturen verbundene Untereinheiten könnten z.B. bei der Probenpräparierung für die Elektronenmikroskopie auf dem Kohlefilm ungünstig adsorbiert werden.

Aus dem zuvor Gesagten ergibt sich, daß sogar für diejenigen Proteine, für die bisher nur eine Antikörperbindungsstelle sowie ausschließlich Dimerbildung durch die entsprechenden Antikörper nachzuweisen war (Tabelle 28), kein Schluß über eine globuläre Proteinform im Ribosom möglich ist. Man kann davon ausgehen, daß - falls diese Proteine gestreckt sind und noch weitere Determinanten zugänglich haben - bei Ausnutzung individualspezifischer Unterschiede mehrerer Antikörperpräparationen in Zukunft auch der Nachweis ihrer elongierten Struktur erbracht werden kann.

Selbst bei der Verwendung vieler verschiedener Antikörper gegen ein und dasselbe Protein läßt die Messung der Abstände zwischen den Antikörperbindungsstellen keine eindeutigen Aussagen über die tatsächliche Länge eines Proteins zu. Da - um es noch einmal zu wiederholen - aufgrund der Organisation der Proteine im Ribosom und/oder methodisch bedingter Faktoren unter Umständen nicht alle Molekülteile eines Proteins mit Antikörpern zu markieren sind, geben die gemessenen Bindungsortabstände lediglich minimale Proteinlängen wieder.

Die Bestimmung elongierter ribosomaler Proteine in situ verlangt besonders strenge Reinheitsnachweise für die getesteten einzelproteinspezifischen Antikörper. Obschon alle verwendeten Immunglobuline aufgrund mehrerer Präzipitationsanalysen das Kriterium "sauberer" Antikörper erfüllen (s. "Materialien und Methoden"), ist nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen gewesen, daß neben den Antikörpern gegen das homologe Protein zusätzlich nichtpräzipitierende, lediglich bindende Antikörper gegen ein heterologes Protein als

Verunreinigung vorliegen. Bei den Antikörperbindungsstudien und der Immun-elektronenmikroskopie - bei Versuchen also, bei denen in erster Linie Anti-körperbindungseffekte und nicht Präzipitationswirkungen nachgewiesen werden - könnten derartige Immunglobuline zum Tragen kommen. Zur Überprüfung der völli-gen Reinheit der für die elektronenoptischen Proteinlokalisationen verwen-deteten IgGs wurden die Antikörper deshalb mit dem homologen Protein abgesät-tigt. Diese Antikörperpräparationen verhielten sich stets wie Nonimmun-IgGs (s. Abschnitt III.2.2.1., Abb. 28). In weiterführenden Untersuchungen zur Proteinstruktur im Ribosom werden in unserer Arbeitsgruppe jetzt vornehmlich solche Antikörper getestet, die mit dem homologen antigenen Protein affini-tätschromatographisch spezifisch angereichert sind (Silman und Katchalski, 1966; Cuatrecasas, 1972, Collatz, Sinha und Stöffler, unveröffentlichte Er-gebnisse; für ein Beispiel s. Tischendorf und Stöffler, 1975). Auf diese Wei-se lassen sich die einzelproteinspezifischen Immunglobuline von möglichen verunreinigenden - präzipitierenden und nichtpräzipitierenden - Antikörpern befreien.

Schließlich stellt sich die Frage, ob identische Aminosäuresequenzen in ver-schiedenen ribosomalen Proteinen die Aussagen über gestreckte Proteinformen einschränken könnten. Der Sequenzvergleich mehrerer Proteine ergab nämlich, daß eine Anzahl von Tetrapeptiden, einige Pentapeptide und sogar ein Hexa-peptid in mehr als einem Protein vorkommen (Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974; Wittmann-Liebold und Dzionara, 1976). Da eine antigene Determinante bekanntlich aus wenigstens 4-6 Aminosäureresten besteht, ist eine Kreuzreak-tion zwischen Antikörpern gegen zwei Proteine mit gleichen Peptiden theore-tisch möglich, in praxi aus folgenden Gründen jedoch kaum denkbar: 1. Deter-minanten natürlicher Proteinantigene sind im allgemeinen größer als die synthetischen Peptide, an denen die minimalen Determinatenausmaße bestimmt wurden (zur Übersicht s. z.B. Arnon, 1971; Benjamini et al., 1972). 2. Die Wahrscheinlichkeit, daß bei der Immunantwort in verschiedenen Tieren gegen unterschiedliche Proteine u.a. genau diese identischen Sequenzbereiche er-kannt werden, ist sehr gering. Falls das dennoch der Fall sein sollte, müß-ten diese Determinanten für eine Kreuzreaktion nicht nur in ihren jeweiligen Proteinen, sondern darüber hinaus auch noch auf der Ribosomenoberfläche zu-gänglich sein.

Zum völligen Ausschluß dieser Möglichkeit bietet sich die zuvor erwähnte affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren an. Jedes einzelprote-inspezifische Immunglobulin wird dabei mit einem Proteingemisch inkubiert,

das alle Proteine außer dem homologen antigenen Protein enthält. Dadurch werden alle Antikörper, die auch mit heterologen Proteinen reagieren können, adsorbiert.

### 1.3. Aussagen über die Nachbarschaft von Proteinen und ihre Verteilung im Ribosom

#### Proteinnachbarschaft

Die Tatsache, daß zumindest einige Proteine im Ribosom elongiert vorliegen, verlangt eine vorsichtige Interpretation der Nachbarschaftsergebnisse. So geben die Vernetzungsexperimente streng genommen nur Nachbarschaften zwischen Molekülteilen verschiedener Proteine wieder; denn anders als bei globulären Proteinen kann nicht mit Sicherheit gefolgert werden, daß ein bifunktionelles Reagens mit den Proteinen an einem Ort in unmittelbarer Umgebung ihrer Molekülmassenzentren reagiert. Entsprechendes gilt auch für einige Ergebnisse der elektronenoptischen Lokalisationsversuche. Die nebeneinanderliegenden Antikörperbindungsorte beispielsweise von S13 und S14 sowie von L14, L19 und L23 - für jedes dieser Proteine ist bislang nur eine Bindungsstelle bestimmt worden (s. Abb. 43 u. 44) - lassen sich nicht weiter deuten, als daß die beiden 30S-Proteine bzw. die drei 50S-Proteine mit Teilen ihrer Molekülkörper benachbart sind. Weitergehende Schlüsse sind hingegen bei mehreren Proteinen mit wenigstens zwei deutlich voneinander entfernten Bindungsorten, d.h. offensichtlich gestreckten Proteinen, möglich. Wie bereits ausgeführt, kann in diesen Fällen auf die hypothetische Anordnung der Proteinfiber im Ribosom geschlossen werden, wenn man zwischen den einzelnen Markierungspunkten Verbindungen herstellt (s. den vorhergehenden Abschnitt 1.2., S. 234). Somit ergibt sich für die Proteine S4, S5, S11 und S12, daß sie mit großen Abschnitten ihrer Körper nebeneinanderliegen sollten (s. Abb. 43). Ferner ist anzunehmen, daß S4 und S6 teilweise benachbart sind; Anti-S6 markiert einen von zwei Orten, in dessen Nähe die Fiber von S4 verlaufen dürfte.

Es erscheint zunächst erstaunlich, daß die Vernetzungsexperimente und die Immunelektronenmikroskopie bisher größtenteils verschiedene Proteinnachbarschaften ergeben haben. Von den zuvor erwähnten elektronenoptisch ermittelten Nachbarschaften konnten lediglich drei durch die Vernetzungsprodukte S4-S5, S4-S6 und S4-S12 bestätigt werden (s. Abb. 21a und Tabelle 26). Die geringe Übereinstimmung bedeutet jedoch keinesfalls, daß sich die Daten

beider Methoden im allgemeinen widersprechen. Vielmehr muß man sich noch einmal vergegenwärtigen, daß aufgrund folgender voneinander abweichender Eigenschaften in beiden Fällen durchaus unterschiedliche, zur generellen Aufklärung von Proteinnachbarschaften sich aber ergänzende Aussagen erwartet werden: 1. Die mittels der Elektronenmikroskopie gemessenen Proteinabstände sind mit 30-50Å größer als die bei den Vernetzungsversuchen bestimmten (9-23Å). 2. Die Reaktionsorte für Antikörper und bifunktionelles Reagens sollten nur selten überlappen und könnten deshalb bei elongierten Proteinen räumlich entfernt sein.

An dieser Stelle sind bereits zwei weitere Methoden zur Nachbarschaftsbestimmung zu behandeln, die Fluoreszenzmarkierung und die Neutronenstreuung. Wie später ausgeführt wird, besitzen diese Techniken zum Teil ähnliche Eigenschaften wie die beiden in dieser Arbeit beschriebenen. Andere Methoden zur Aufklärung von Proteinnachbarschaften werden im folgenden Abschnitt 2. zusammenhängend behandelt.

Das Prinzip der Fluoreszenzmarkierungsversuche beruht darauf, daß zwei ribosomale Proteine in isoliertem Zustand mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend zusammen mit den übrigen unmarkierten Proteinen sowie unbehandelter RNS in Untereinheiten rekonstituiert werden (Huang et al., 1975; zur Übersicht s. Cantor et al., 1974b). Durch elektromagnetische Wellen bestimmter Energie wird im Ribosom einer der Farbstoffe angeregt, der dann - bei ausreichender Nachbarschaft zum zweiten Farbstoff - anstatt selbst zu fluoreszieren, die Energie als sogenannter "Donator" auf das zweite Molekül, den "Akzeptor", überträgt. Mit Hilfe von Messungen des Energieübertragungspotentials wird die Entfernung zwischen den beiden Proteinen bestimmt, wobei von der Annahme globulärer Proteine ausgegangen wird (Tabelle 29). Trotz dieser starken Vereinfachung zeigt sich, daß fünf der Proteinpaare mit "sehr nahe" oder "nahe" nebeneinanderliegenden Proteinen auch bei Vernetzungsexperimenten als Paare ermittelt wurden (Tabelle 29). Allein für das Paar S14-S19 wird keine Übereinstimmung beobachtet. Wie zuvor beim Vergleich der Vernetzungs- und Elektronenmikroskopiedaten erklärt, sollte auch dieser Befund auf gestreckten Proteinformen beruhen.

Die Anwendung der Neutronenstreuungsmethode setzt voraus, daß zuerst Untereinheiten rekonstituiert werden, die zwei Deuterium-markierte Proteine und sonst jeweils unmarkierte Proteine und RNS enthalten (Engelman et al., 1975).

Tabelle 29. Fluoreszenzmarkierungsversuche - Abstände zwischen mehreren 30S-Proteinen *in situ* und Vergleich zu Vernetzungsergebnissen

| Fluoreszenzmarkierung<br>Abstand <sup>*)</sup> Proteinpaar | Vernetzung<br>Proteinpaar <sup>++)</sup>                                      | Fluoreszenzmarkierung<br>Abstand <sup>*)</sup> Proteinpaar  | Vernetzung<br>Proteinpaar <sup>++)</sup> |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| "sehr nah"                                                 | S6-S18<br>S7-S9<br>S8-S15<br>S16- od. S17-S20                                 | "weit"<br>S4-S15<br>S4-S19<br>S15-S18<br>S15-S19<br>S19-S20 | -<br>-<br>-<br>-<br>-                    |
| "nah"                                                      | S4-S13<br>S4-S20<br>S4-S16 od. -S17<br>S13-S19<br>S13-S20<br>S15-S16 od. -S17 | "sehr weit"<br>S4-S18<br>S13-S16 od. -S17<br>S14-S19        | -<br>-<br>-<br>S14-S19                   |

+) Die Abstände geben die jeweiligen Distanzen zwischen den beiden Proteinmassenzentren wieder; dabei werden die Proteine vereinfachend als globuläre Moleküle mit einem Durchmesser von ca. 30Å angenommen.

"sehr nah": -40Å Abstand "nah": >40-55Å Abstand "weit": 60-70Å Abstand "sehr weit": >70Å Abstand

++) Es sind die als "sicher" klassifizierten Proteinpaare berücksichtigt (s. Tabelle 26a-c, Abb. 21a).

+++ Die Vernetzung zwischen S8 und S15 ist in Abschnitt II.3.2. (s. Tabelle 26c) nicht als "sicher" gewertet worden, kann jetzt aber unter Berücksichtigung des Resultats aus den Fluoreszenzmarkierungsversuchen als wahrscheinlich angesehen werden.



Die Neutronenstreuungsmuster dieser Subpartikel geben Auskunft über die Distanz zwischen den beiden markierten Proteinen im Ribosom. Die Auswertungen lassen zwar Hinweise auf die Form der Proteine zu <sup>+)</sup> , jedoch beschränken sich die Entfernungsangaben auch hierbei nur auf die Abstände zwischen den Proteinmassenzentren. Auf diese Weise wurden die Entfernungen für drei Proteinpaare (S2-S5, S5-S8, S3-S7) gemessen. In Übereinstimmung mit den Vernetzungsergebnissen zeigte sich, daß S5 und S8 eng benachbart sind (35Å Abstand). Für S2-S5 wurden 105Å, für S3-S7 115Å bestimmt.

Berücksichtigt man die wesentlichen Eigenschaften der vier Methoden zur Aufklärung der räumlichen Proteinorganisation im Ribosom, so kann folgendes zusammengefaßt werden: Die Immunelektronenmikroskopie, Fluoreszenzmarkierung und Neutronenstreuung geben nicht nur wie die Vernetzungsuntersuchungen Aufklärung über benachbarte, sondern auch über entfernte Proteine. Von größerer Bedeutung ist aber, daß allein mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die Proteine ribosomalen Strukturmerkmalen direkt zugeordnet werden können; mit dieser Methode erhält man somit Aufschluß über "absolute" Proteinanordnungen im Ribosom. Den übrigen drei Techniken fehlt diese Qualität; sie geben deshalb lediglich die "relative" Organisation der Proteine zueinander wieder.

Die Vernetzungs- und Fluoreszenzmarkierungsstudien erlauben unter gewissen Bedingungen, "relative" Nachbarschaften zwischen zwei Aminosäuren in bestimmten Sequenzbereichen zweier Proteine zu ermitteln. Das setzt voraus, daß die Spezifität des Reagens' nur gegen eine Aminosäure gerichtet ist, diese in jedem der Proteine darüber hinaus nur einmal vorkommt und die vollständige Sequenz der beiden Proteine bereits vorliegt. Eine derartige Aussage läßt sich beispielhaft am Proteinpaar S18-S21 demonstrieren, das durch das Cystein-spezifische PDM gebildet wird (s. die Abschnitte II.2.1. u. II.3.2.b sowie Tabelle 26b). Beide Proteine enthalten jeweils nur ein Cystein - S18 in Position 10 und S21 in Position 22 (Vandekerckhove et al., 1975; Yaguchi, 1975). Daraus folgt, daß S18 und S21 zumindest mit Teilen ihrer N-proximalen Abschnitte nebeneinanderliegen. Zu vergleichbaren Ergebnissen könnte man theoretisch auch mittels der Immunelektronenmikroskopie

---

<sup>+)</sup>  S2 ist nach diesen Untersuchungen gestreckt, S8 sowie S5 sind hingegen kompakt. Das Ergebnis für letzteres Protein steht in offensichtlichem Widerspruch zu den immunelektronenoptischen Daten, die ja für S5 mit Sicherheit eine elongierte Form zeigen (s. Abb. 43).



kommen, jedoch müßte man dafür erst Antikörper gegen einzelne Sequenzbereiche, also Proteinfragmente, gewinnen. Dabei ist aber zu beachten, daß eine so enge Nachbarschaft im Abstand von nur ca.  $10\text{\AA}$ , wie sie das Verknüpfungsergebnis ergibt, nicht ohne weiteres durch die Lokalisation von zwei Antikörperbindungsstellen zu bestimmen ist. Beide Bindungsstellen wären nämlich elektronenoptisch ununterscheidbar und somit dem gleichen Ort auf der Ribosomenoberfläche zuzuordnen. In einem derartigen Sonderfall müßte dann durch aufwendige Kontrollexperimente sichergestellt werden, daß die Markierung der offenbar gleichen Stelle nicht auf Artefakte zurückzuführen ist.

### Proteinverteilung

Unter räumlichen Gesichtspunkten sollten gestreckte Proteine verhältnismäßig mehr Nachbarschaften untereinander aufweisen als globuläre: Ein globuläres Protein kann in einer Ebene mit nur maximal 6 und im Raum mit nicht mehr als 12 anderen globulären Proteinen in direktem Kontakt sein (bei dichtester Packung gleichgroßer Kugeln). Dagegen könnte ein gestrecktes Protein, das mit seiner Fiber beispielsweise die 30S Subpartikel an ihrer längsten Stelle völlig durchzieht, im Extremfall an jedes der 20 übrigen Proteine stoßen, wenn auch diese elongiert und nicht ausschließlich parallel zum betreffenden Protein angeordnet sind. Nach dieser theoretischen Betrachtung ist es bemerkenswert, daß 1. die Vernetzungsexperimente bisher nicht mehr Nachbarschaften ergaben, als in Tabelle 26 zusammengestellt, und 2. die bifunktionellen Reagenzien eine bestimmte Kettenlänge zur erfolgreichen Verknüpfung aufweisen müssen (Bickle et al., 1972; Lutter et al., 1974a): Vergleichende Studien mit den Imidoestern DMM (Dimethylmalonimidat), das  $5\text{\AA}$  voneinander entfernte Lysine vernetzen kann, DMA ( $9\text{\AA}$ ) und DMSub ( $12\text{\AA}$ ) ergaben, daß DMM im Gegensatz zu den anderen beiden Reagenzien zu keinen Vernetzungsprodukten führt.

Die geringe Ausbeute an Proteinkomplexen im allgemeinen und die ausbleibende Aggregation durch das  $5\text{\AA}$ -Reagens DMM im speziellen kann nicht auf der chemischen Beschaffenheit der Proteine beruhen; denn jedes 30S-Protein besitzt durchschnittlich 16 der entsprechenden reaktiven Lysinseitenketten (s. Kurland, 1974a), von denen im Ribosom zweidrittel reaktiv sind (Slobin, 1972). Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde gefolgert, daß die ribosomalen Proteine in situ nicht in direkten Kontakt miteinander treten (Kurland, 1974a). Unter der vereinfachenden Voraussetzung, daß die Proteine globulär sind sowie einen durchschnittlichen Durchmesser von  $34\text{\AA}$  haben und die 30S Untereinheit ein abgeflachtes Ellipsoid ist ( $50\text{\AA} \times 224\text{\AA} \times 224\text{\AA}$ ), schlug

Kurland für diese Subpartikel folgendes vor: Die Proteine sind als "Monolayer", d.h. als einmolekulare Schicht, in einer rRNS-Matrix räumlich gleichmäßig verteilt und interagieren möglicherweise direkt mit der RNS. Dieses Modell wird in der Literatur als "Mixed Neighborhood Model" bezeichnet.

Zu erwähnen ist weiterhin ein Modell, das Hill und Fessenden (1974) aus Röntgen-Kleinwinkelstreuungsuntersuchungen herleiteten. Auch danach sollten in abgeflachten ellipsoiden 30S Partikeln die Proteine als globuläre Moleküle in einem "Monolayer" mit der rRNS gleichmäßig verteilt sein.

Experimentelle Bestimmung der Proteinverteilung in der 30S Untereinheit wurde in Neutronenstreuungsversuchen erbracht (Moore et al., 1975). Es zeigte sich zwar, daß der Proteinanteil etwas mehr an der Peripherie der Partikel liegt als die RNS, jedoch ließ die nur geringfügige räumliche Trennung zwischen Protein- und RNS-Massenzentrum auf eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Proteine und RNS schließen.

Gleichverteilung der 30S-Proteine kann anhand der zur Zeit vorliegenden immunelektronenmikroskopischen Resultate weder mit Sicherheit bestätigt noch ausgeschlossen werden. Weiterführende Untersuchungen ergaben eine gewisse Konzentration von Antikörperbindungsstellen in der "Kopfregion" (Tischendorf et al., 1975). Berücksichtigt man aber bei den gestreckten Proteinen den Verlauf ihrer Molekülkörper in der Partikel, dann scheint sich eine annähernd regelmäßige Proteinverteilung herauszubilden, die mit den zuvor besprochenen Angaben durchaus in Einklang sein kann. Unvereinbar mit den elektronenoptischen Daten ist hingegen die Vorstellung einer abgeflachten Untereinheit mit einem generellen Protein-"Monolayer". Wie bereits aus Abbildung 43 zu ersehen ist, können die elongierten Proteine S4, S5, S11 und S12 nur dann in der engen "Halsregion" der gestreckten 30S Partikel benachbart angeordnet sein, wenn sie einen "Multilayer" bilden.

Für die 50S Untereinheit wurde in Neutronenstreuungsversuchen ermittelt, daß die Proteine in dieser Subpartikel ungleichmäßig verteilt sind; Protein- und RNS-Anteil weisen voneinander deutlich entfernte Massenzentren auf (Moore et al., 1974). Die bisher bekannten Proteinortsangaben auf der Oberfläche der 50S Untereinheit deuten ebenfalls eine räumlich ungleichmäßige Proteinverteilung an (Tischendorf et al., 1975). Es bleibt abzuwarten, ob dieses Bild bei weiteren elektronenmikroskopischen Versuchen bestätigt wird.

## 2. Weitere Ergebnisse über die räumliche Proteinanordnung im Ribosom

Im folgenden Abschnitt sollen schwerpunktmäßig in zwei Teilen andere wichtige Untersuchungen vorgestellt werden, die Aufschluß über die Topographie ribosomaler Proteine in situ erbracht haben. Im ersten Teil werden Studien an Ribonukleoprotein-Fragmenten beider Untereinheiten behandelt. Nach der Besprechung dieser Experimente sind dann zusammen mit den Untersuchungen zur Proteinzugänglichkeit im Ribosom, der Immunelektronenmikroskopie, der Proteinvernetzung, der Fluoreszenzmarkierung sowie der Neutronenstreuung alle wesentlichen strukturellen Versuche und somit auch die dabei angewendeten Methoden zur Aufklärung der Proteintopographie berücksichtigt. Den zweiten Teil bildet die Diskussion sogenannter funktionsabgeleiteter Proteinnachbarschaften, d.h. benachbarter Proteinanordnungen, die sich aus Funktionsanalysen schließen lassen.

Sofern sich offensichtliche Zusammenhänge zwischen den im Folgenden aufgeführten Resultaten und den bisher abgehandelten Nachbarschaftsdaten ergeben, wird dies beachtet. Bei den Vernetzungsergebnissen wird dann auf die in Tabelle 26a-c und Abbildung 21a als abgesichert klassifizierten Proteinpaaere verwiesen, während bei den immunelektronenoptischen Daten auf die Auswahl in den Abbildungen 43 und 44 Bezug genommen wird.

### 2.1. Ribonukleoprotein-Fragmente - Aussagen über Protein-RNS-Wechselwirkungen und Proteinnachbarschaften

#### a. Bestimmung der Proteinbindungsorte auf der 16S, 23S und 5S rRNS

Komplexe aus isolierter rRNS und einem der sogenannten primären Bindungsproteine - diese ribosomalen Proteine binden unabhängig spezifisch an rRNS - werden schonend mit Ribonuklease (RNase) inkubiert (zur Übersicht s. Zimmermann, 1974). Unter diesen Bedingungen bleibt die vom Protein besetzte RNS-Region unverdaut, während die freien RNS-Teile hydrolysiert werden. Nach der Isolierung der entstandenen Ribonukleoprotein-(RNP-)Fragmente trennt man die RNS vom Protein, extrahiert sie und untersucht sie schließlich auf ihre Fähigkeit, mit Proteinen zu interagieren. Ein RNS-Stück, das durch ein Einzelprotein gegen RNase-Angriff geschützt und mit dem entsprechenden Protein reversibel wechselwirken kann, ist als Proteinbindungsstelle anzusehen. Folgende Spezifitätskriterien liegen dabei zugrunde: 1. Die Bindung eines Proteins muß ausschließlich mit einem rRNS-Typ bzw. Fragment vonstatten gehen, selbst wenn andere rRNS anwesend ist. 2. Das molare Verhältnis von Protein:

RNS soll 1:1 weder unter- noch überschreiten.

Da die Primärstrukturen von 16S und 5S RNS bereits vollständig und von 23S RNS zum Teil bekannt sind (Brownlee et al., 1968; Ehresmann et al., 1972, 1975; Fellner et al., 1972; zur Übersicht s. Fellner, 1974, und Monier, 1974), können die durch "Finger Printing" ermittelten Nukleotidsequenzen der Bindungsstellen bestimmten Teilen der RNS-Moleküle zugeordnet werden. Auf diese Weise kann man direkte Protein-RNS-Nachbarschaften im Ribosom ermitteln, wenn davon ausgegangen wird, daß die in vitro nachgewiesenen Wechselwirkungen auch im intakten Ribosom bestehen. Unter derselben Voraussetzung lassen darüber hinaus engbenachbarte oder gar überlappende Proteinbindungsstellen auf die Nachbarschaft der entsprechenden ribosomalen Proteine in situ schließen.

Die Verteilung der Bindungsorte der primären Bindungsproteine auf der 16S RNS (S1, S4, S7, S8, S15 und S20) ist in Abbildung 46, die der primären Bindungsproteine auf der 23S RNS (L1, L2, L3, L4, L6, L13, L16, L20, L23 und L24) in Abbildung 47 zusammengefaßt (für die jeweiligen Referenzen s. ebenda). Bindungsproteine auf der 5S RNS sind L5, L18 und L25 (Horne und Erdmann, 1972; Gray et al., 1973; Yu und Wittmann, 1973).

Aufgrund der Kleinheit der 5S RNS (120 Nukleotide) kann von vornherein angenommen werden, daß die Bindungsorte der drei Proteine und somit die Proteine selbst nahe beieinander liegen. RNase-Verdauungsstudien mit Protein-RNS-Komplexen ergaben in der Tat, daß L18 und L25 an einer begrenzten doppelhelikalen Region anlagern, die den 3'- und 5'-Terminus der 5S RNS enthält. Vergleichbar klare Aussagen lassen sich nur noch für die 30S-Proteine S4, S8, S15 und S20 treffen. S4 und S20 einerseits sowie S8 und S15 andererseits haben jeweils partiell überlappende Anlagerungsstellen im 12S-Fragment der 16S RNS<sup>\*)</sup> (Abb. 46). S4 und S20 sollten demnach ebenso wie S8 und S15 im Ribosom engbenachbart vorkommen. Wie später noch einmal gesondert zusammengefaßt wird, ist diese Aussage in Übereinstimmung mit Vernetzungs- und/oder Fluoreszenzmarkierungsdaten (s. S. 252). Die anderen Proteine haben entweder keine nebeneinanderliegenden Bindungsorte auf der RNS oder - und das gilt für mehrere der 50S-Proteine - konnten die Orte erst dem großen

---

<sup>\*)</sup> 16S und 23S RNS lassen sich unter bestimmten Bedingungen durch RNase in jeweils zwei Fragmente verdauen: die 16S RNS in ein 12S- und 8S-Fragment, die 23S RNS in ein 13S- und 18S-Fragment (Abb. 46 u. 47).

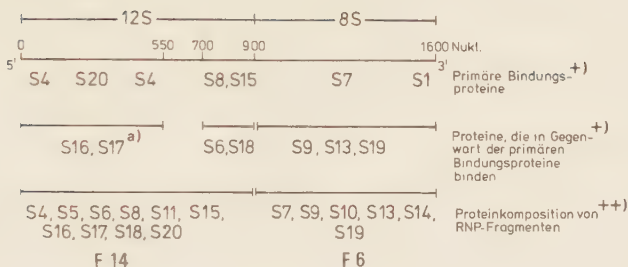


Abb. 46. Proteinbindungsorte auf der 16S RNS

Für Einzelheiten s. Text.

+) Mizushima und Nomura, 1970; Schaup et al., 1970, 1971, 1973; Schaup und Kurland, 1972; Garrett et al., 1971; Stöffler et al., 1971a; Zimmermann et al., 1972, 1974; Green und Kurland, 1973; Held et al., 1974; Muto et al., 1974; Dahlberg und Dahlberg, 1975; Ungewickell et al., 1975; zur Übersicht s. Zimmermann, 1974 und Zimmermann et al., 1975 (Diese Autoren untersuchten die Proteinbindung und/oder bestimmten die Bindungsorte.)

• ++) Morgan und Brimacombe, 1973

a) S17 ist bei einigen Untersuchungen ein primäres Bindungsprotein (zur Übersicht s. Zimmermann, 1974).

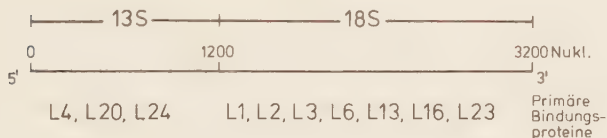


Abb. 47. Proteinbindungsorte auf der 23S RNS

Für Einzelheiten s. Text.

Stöffler et al., 1971a, b; Branlant et al., 1973, 1975; Garrett et al., 1974; Spierer et al., 1975; zur Übersicht s. Zimmermann, 1974



13S- oder 18S-Fragment der 23S RNS<sup>+</sup>) zugeordnet werden, ohne daß eine Abgrenzung der Bindungsstellen voneinander möglich war.

## b. Verteilung ribosomaler Proteine in Ribonukleoprotein-Partikeln

### Rekonstituierte Partikel

Analog zu den oben beschriebenen Versuchen wird isolierte rRNS mit ribosomalen Proteinen inkubiert, jedoch wird hierbei die Bindung von Proteinen untersucht, die nicht allein, sondern nur in Gegenwart der primären Bindungsproteine mit der RNS wechselwirken (zur Übersicht s. Zimmermann, 1974). Durch RNase-Verdauungsversuche ließen sich auf der 16S RNS die Bindungsstellen der Proteine S16 und S17 dem 5'-proximalen Abschnitt mit S4 und S20 zuordnen (Abb. 46) (für Referenzen s. ebenda). Die gemeinsame Anordnung der vier Proteinbindungsstelle in diesem Teil der 16S RNS läßt mit einiger Sicherheit auf die Nachbarschaft von S4, S16, S17 und S20 in der 30S Untereinheit schließen. Entsprechend kann angenommen werden, daß S6, S8, S15 und S18 sowie S1, S7, S9, S13 und S19 jeweils benachbart sind. S6 und S18 binden bei S8 und S15, während S9, S13 und S19 am 3'-proximalen RNS-Abschnitt ihre Bindungsstellen haben, dort also, wo auch S1 und S7 mit der RNS reagieren (Abb. 46).

### Intakte Untereinheiten

Im Gegensatz zu den beiden zuvor erwähnten Studien werden bei diesen Versuchen nicht rekonstituierte Protein-RNS-Komplexe, sondern intakte Untereinheiten mit RNase verdaut (zur Übersicht s. Zimmermann, 1974). Die daraus resultierenden RNP-Fragmente werden dann auf ihren Protein- und RNS-Gehalt untersucht, wobei man aufgrund des zuvor Ausgesagten über die "Proteinverteilung im Ribosom" (s. S. 243) zumindest für die 30S Untereinheit annehmen kann, daß die Proteine in den Fragmenten mit der RNS wechselwirken, also Bindungsstellen auf der RNS besitzen (s. auch Kurland, 1974a). Proteine solcher RNPs sollten im Ribosom in gewisser Nachbarschaft zueinander vorliegen, weil es unwahrscheinlich ist, daß ein RNP-Komplex mit verstreuten Proteingruppen, die durch einen ungeschützten RNS-Strang verbunden sind, die RNase-Behandlung übersteht. Um derartige Aussagen treffen zu können, haben

---

<sup>+</sup>) s. Fußnote auf S. 246.



die Komplexe folgende Kriterien zu erfüllen: 1. Sie müssen einheitliche Fragmenttypen sein. 2. Das Massenverhältnis von RNS:Protein im Fragment muß dem entsprechen, wie es in intakten Ribosomen vorliegt. 3. Durch Verdauung und Entfaltung des Ribosoms darf die Spezifität der Protein-RNS-Wechselwirkung nicht beeinflusst werden (Newton et al., 1975).

Die Proteinorganisation in der 30S Untereinheit wurde mit Hilfe dieser Methode von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Schendel et al., 1972; Morgan und Brimacombe, 1973; Roth und Nierhaus, 1973). Die Autoren wiesen jeweils zwei RNP-Fragmente nach, von denen sich - trotz teilweise unterschiedlicher Proteinzusammensetzung - das "7S"-Fragment von Schendel et al., der "RNP II"-Komplex von Roth und Nierhaus und das "F 14"-Fragment von Morgan und Brimacombe eindeutig einander zuordnen lassen (Tabelle 30). Die Proteine dieser drei Fragmente sollten im Ribosom benachbart vorliegen. Dasselbe gilt für die Proteine der "RNP III"- und "F 6"-Fragmente, die ebenfalls nahezu gleiche Proteinzusammensetzungen haben. Der "15S"-Komplex weist zwar teilweise dieselben Proteine wie die beiden zuletzt genannten Fragmente auf, jedoch ist er zu groß, um Aussagen über Proteinnachbarschaften treffen zu können.

Entsprechende Untersuchungen wurden an 50S Untereinheiten vorgenommen. Die zuerst von Allet und Spahr (1971) durchgeführten Experimente sind nur unter Vorbehalt zu werten, weil die gewählten Pufferbedingungen eine Beeinflussung der spezifischen Protein-RNS-Wechselwirkung nicht ausschließen lassen (Newton et al., 1975). Erst kürzlich wurden einige RNP-Fragmente von intakten 50S Untereinheiten (Newton und Brimacombe, 1974) oder 50S-"Core Partikeln" (Roth und Nierhaus, 1975) analysiert, die - frei von dieser Einschränkung - Hinweise auf die Anordnung von 50S-Proteinen in situ geben (Tabelle 31). Die Autoren nahmen an, daß folgende Proteine, die jeweils in sehr kleinen RNP-Fragmenten vorliegen, engbenachbart sind: (L1,L9), (L1,L23), (L3,L4,L24) und (L5,L18) bzw. (L5,L18,L25). Aufgrund überlappender Proteinkompositionen etwas größerer Komplexe mit einem der kleinen Fragmente wurde gefolgert, daß in der Nähe von (L1,L23) die Proteine L3, L4, L5, L8/L9, L18 und L24 und in der Umgebung von (L3,L4,L24) die Proteine L5, L13, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L28 und L29 vorkommen dürften.

Für die 30S Untereinheit wird zum Vergleich mit den bisher behandelten Nachbarschaftsdaten auf die RNP-Fragmente von Morgan und Brimacombe (1973) Bezug

Tabelle 30. Proteinzusammensetzung von Ribonukleoprotein-Fragmenten der 30S Untereinheit

| Protein | Schendel et al.,<br>1972 |       | Roth u. Nierhaus,<br>1973 |           | Morgan u. Brimacombe,<br>1973 |       |
|---------|--------------------------|-------|---------------------------|-----------|-------------------------------|-------|
|         | "7S"                     | "15S" | "RNP II"                  | "RNP III" | "F 14"                        | "F 6" |
| S1      | +                        | +     |                           |           |                               |       |
| S2      |                          | +     |                           |           |                               |       |
| S3      |                          | +     |                           |           |                               |       |
| S4      | +                        | +     | +                         |           | +                             |       |
| S5      | +                        | +     | +                         |           | +                             |       |
| S6      | +                        |       |                           |           | +                             |       |
| S7      |                          | +     |                           | +         |                               | +     |
| S8      |                          | +     | +                         |           | +                             |       |
| S9      |                          | +     |                           | +         |                               | +     |
| S10     |                          | +     |                           | +         |                               | +     |
| S11     |                          |       |                           |           | +                             |       |
| S12     |                          | } +   |                           |           |                               |       |
| S13     |                          |       | +                         | +         |                               | +     |
| S14     |                          | +     |                           |           |                               | +     |
| S15     | +                        |       | +                         |           | +                             |       |
| S16     | +                        |       | +                         |           | } +                           |       |
| S17     | +                        |       | +                         |           |                               |       |
| S18     |                          |       |                           |           | +                             |       |
| S19     |                          | +     |                           | +         |                               | +     |
| S20     | +                        |       | +                         |           | +                             |       |
| S21     |                          |       |                           |           |                               |       |

Tabelle 31. Proteinzusammensetzung einiger Ribonukleoprotein-Fragmente  
der 50S Untereinheit

[illegible]

genommen. Diese beiden RNPs sind einerseits für die übrigen Fragmente repräsentativ und enthalten andererseits (bis auf S1) alle primären und sekundären Bindungsproteine (Abb. 46). Letztere Übereinstimmung sowie Sequenzbestimmungen der in den Fragmenten enthaltenen RNS (Yuki und Brimacombe, 1975) erlauben, "F 14" der 5'-proximalen und "F 6" der 3'-proximalen Hälfte der 16S RNS zuzuordnen. Die aus den benachbarten Positionen der Bindungsorte primärer und sekundärer Bindungsproteine geschlossenen Proteinnachbarschaften werden damit unterstützt. Für Protein S1 bekräftigt ein Ergebnis aus Protein-RNS-Vernetzungsexperimenten, daß es am 3'-Ende der RNS bindet: In 30S Untereinheiten, denen der 3'-Terminus ihrer 16S RNS durch Oxydation chemisch aktiviert wird, geht die RNS mit S1 (und S21) eine kovalente Bindung ein (Kenner, 1973; Czernilofsky et al., 1975).

Für mehrere Proteine des "F 14"-Fragments wurde ihre benachbarte Anordnung auch in Fluoreszenzmarkierungs-, Neutronenstreuungs- und vor allem Vernetzungsversuchen gefunden (s. Abb. 21a, Tabellen 26a-c u. 29, s. auch Abschnitt 1.3. der Schlußdiskussion). Das trifft für folgende Proteinpaare zu: S4-S5, S4-S6, S4-S8, S4-S20, S5-S8, S6-S18 und S8-S15. Ebenso wies man mit den Paaren S7-S9, S13-S19 und S14-S19 Proteinnachbarschaften nach, die das "F 6"-Fragment widerspiegelt.

Zusätzlich sind Nachbarschaften zwischen je zwei Proteinen bekannt, von denen das eine im "F 14"- und das andere im "F 6"-Fragment vorkommt (z.B. S4-S9, S4-S13, S5-S9, S7-S8 und S13-S20). Derartige Proteinpaare könnten die relative Nachbarschaft zwischen 5'- und 3'-proximalen Abschnitten der 16S RNS im Ribosom wiedergeben. Sichere Aussagen darüber sind jedoch offensichtlich erst dann möglich, wenn bekannt ist, welche Form die Proteine aufweisen und - im Falle gestreckter Moleküle - an welchem Ort des jeweiligen Proteinkörpers die RNS bindet.

Dieselbe Voraussetzung muß zugrunde gelegt werden, wenn man anhand der elektronenoptisch bestimmten Ortsangaben für RNS-Bindungsproteine mit einiger Sicherheit auf die Anordnung der RNS im Ribosom schließen will. Da diese Bedingung bisher aber noch nicht erfüllt wird, läßt sich unter Berücksichtigung der Auswahl der Proteinortsangaben in Abbildung 43 lediglich aussagen, daß vermutlich zusammen mit den Proteinen S13, S14 und S19, welche die 3'-Hälfte der RNS besetzen, auch Abschnitte dieses RNS-Teils im "Kopf" der 30S Untereinheit vorkommen. Die 5'-Hälfte der RNS könnte in "Kopf" und "Körper" vorliegen, wenn man die Verteilung der Proteine S4, S5, S6 und S11 in Betracht

zieht (Abb. 43). Im übrigen ist es durchaus vorstellbar, daß die 16S RNS mit ihrem Strang die 30S Subpartikel - unter Umständen sogar mehrmals - durchzieht; die 16S RNS ist nämlich, jede Wechselwirkung zwischen entfernten Sequenzbereichen wie etwa Basenpaarung außer acht lassend, in "gestapeltem" Zustand<sup>\*)</sup> nahezu 5000Å (3Å x 1600 Nukleotide) lang.

Für die Besprechung der Protein-RNS-Wechselwirkungen in der 50S Untereinheit lassen sich nur wenige elektronenoptische Daten heranziehen. Mehrere 23S RNS-Bindungsproteine (L1, L4, L6, L16 und L23) wurden in der Nähe der rechten Protuberanz bzw. im "Sitz" und dessen Umgebung lokalisiert (Abb. 44). Das legt die Vermutung nahe, daß dort auch Teile der 23S RNS vorliegen. Von den Proteinen, die mit der 5S RNS wechselwirken, konnte bis jetzt L18 auf der rechten Protuberanz nachgewiesen werden (Abb. 44). Es bleibt abzuwarten, ob die anderen beiden 5S RNS-Bindungsproteine L5 und L25 ebenfalls in dieser Region zu bestimmen sind und sich somit weitere Hinweise auf die dortige Anordnung der 5S RNS ergeben.

Schließlich zeigt sich für beide Subpartikel, daß mehrere RNS-Bindungsproteine auch Proteine des Untereinheiten-Grenzbereiches sind (s. Tabellen 27a u. b). Dieser Befund und die Beobachtung, daß 16S und 23S RNS zueinander komplementäre Sequenzbereiche aufweisen, die nach Modellvorstellungen im undissoziierten 70S Ribosom basenpaaren könnten (van Duin et al., 1976), lassen es möglich erscheinen, daß RNS im Grenzbereich angeordnet ist.

## 2.2. Funktionsabgeleitete Proteinnachbarschaften

Im folgenden Teil werden unter Berücksichtigung jeweils einer bestimmten ribosomalen Teilfunktion die Daten verschiedener funktioneller Methoden zusammengefaßt. Zeigt sich dabei, daß zwei oder mehr Proteine Einfluß auf eine Teilfunktion nehmen, dann ergeben sich daraus Hinweise auf die benachbarte Anordnung dieser Proteine am entsprechenden Funktionszentrum. Auf diese Weise werden Aussagen über die Proteinkompositionen der mRNS- und tRNS-Bindungsstellen, der "Fidelity Gruppe", des Peptidyltransferase-

---

<sup>\*)</sup> In "gestapeltem" Zustand gehen die nebeneinanderliegenden Basen innerhalb einer Nukleotidkette hydrophobe Wechselwirkungen ein. Diese senkrecht zur Ebene der Basen wirkenden Kräfte werden "Stapelkräfte" oder "Stacking Forces" genannt.

Zentrums, des GTPase-Zentrums sowie des Bindungsortes für einige Faktoren getroffen. Weiterhin wird kurz die "Assembly Map" vorgestellt.

Die einzelnen funktionellen Techniken, die anhand von Beispielen bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit einzeln präsentiert wurden (s. Abschnitt 3. der Einleitung), sollen hier noch einmal kurz aufgeführt werden:

1. die Rekonstitution und ihre verschiedenen Anwendungen zur Zuordnung ribosomaler Einzelproteine zu Funktionszentren (s. S. 18),
2. die Bestimmung durch Mutation veränderter Proteine in Ribosomen antibiotikaresistenter Zellen und sich daraus ergebende Hinweise auf die Anordnung eines solchen Proteins am ribosomalen Bindungs- und Wirkungsort eines Antibiotikums (s. S. 21),
3. die chemische Modifikation ribosomaler Proteine und ihre Auswirkung auf ribosomale Teilfunktionen (s. S. 24),
4. die Affinitätsmarkierung ribosomaler Proteine in situ mit Substraten, die während des Funktionszyklus an das Ribosom binden (z.B. mRNA, tRNA, Faktoren, Antibiotika) (s. S. 25),
5. die Bindung einzelproteinspezifischer Antikörper an das Ribosom und dadurch hervorgerufene Hemmungen ribosomaler Teilfunktionen (s. S. 25).

Es ist zu fragen, inwieweit die einzelnen Funktionsmethoden sichere Aussagen über die physikalische Anordnung der Proteine an einem Funktionszentrum erlauben. Diejenigen chemischen Modifikationsversuche, bei denen die ribosomalen Proteine in situ modifiziert werden, die immunologischen Experimente und die Affinitätsmarkierungsuntersuchungen geben mit einiger Sicherheit zuverlässige Proteinnachbarschaften wieder; während in den beiden erstgenannten Fällen ein funktionelles Zentrum durch ein Reagens oder einen Antikörper direkt blockiert wird, so daß ein dort sonst bindendes Substrat nicht am Ribosom anlagern kann, geht im letzten Fall ein Substrat mit einem Protein direkt am Funktionsort eine kovalente Bindung ein. Dagegen lassen alle Rekonstitutionsversuche sowie die Untersuchungen an Ribosomen antibiotikaresistenter Mutanten nur bedingt auf benachbarte Proteinanordnungen schließen. Die maßgebliche Einschränkung bei diesen Experimenten ist, daß für die eine Teilfunktion beeinflussenden Proteine nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann, daß ihre Effekte statt auf unmittelbarer Nähe zum funktionellen Zentrum auf Fernwirkungen im Ribosom, also kooperativen Einflüssen, beruhen. Wie sich im Folgenden aber zeigt, werden viele mögliche Proteinnachbarschaften, die sich aus diesen beiden Funktionsstudien ableiten lassen, durch Ergebnisse aus Strukturuntersuchungen bestätigt.



In einigen Fällen können einzelne Funktionszentren bestimmten Strukturmerkmalen auf der Ribosomenoberfläche zugeordnet werden, wenn man die Ortsangaben für die am Zentrum vorliegenden Proteine berücksichtigt. Da aber, wie zuvor bereits ausgeführt, die Hauptaufgabe der folgenden Betrachtung im Aufzeigen anderer Wege zur Aufklärung der Proteintopographie liegt, werden die dreidimensionalen Angaben nur selten modellartigen Charakter haben, zumal - vor allem für die 50S Untereinheit - noch gar nicht alle Proteine lokalisiert sind und von allen bisher bekannten Proteinortsangaben hier nur eine Auswahl berücksichtigt wird (Abb. 43 u. 44). Einer späteren Arbeit bleibt es überlassen, unter Einbeziehung vollständigerer Ortsangaben sowie weiterer Daten über die Proteinorganisation die dreidimensionale Struktur des Ribosoms in einem Modell umfassend zu diskutieren.

#### 2.2.1. Die "Assembly Map" - Aussagen über Proteinnachbarschaften

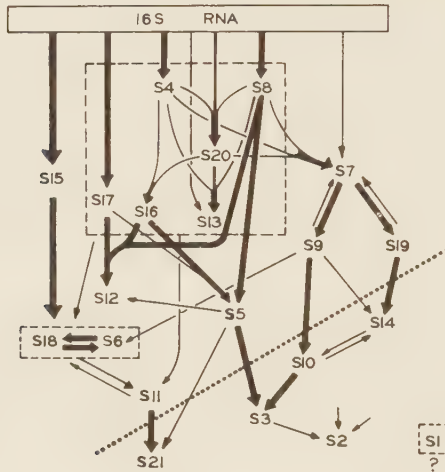
Die "Assembly Map" faßt für die 30S Untereinheit Protein-Protein-Wechselwirkungen zusammen, die sich unter Ausnutzung des Rekonstitutionssystems von Traub und Nomura (1968) ermitteln ließen (Abb. 48) (Mizushima und Nomura, 1970; Held et al., 1974; zur Übersicht s. Nomura, 1973, 1974, sowie Nomura und Held, 1974). Mit Hilfe schrittweiser Rekonstitutionsversuche wurde bestimmt, welches Protein den Einbau eines anderen bedingt (s. auch S. 18). Soeben wurde ausgeführt, daß die sich ergebenden Protein-Protein-Interaktionen aufgrund möglicher kooperativer Effekte nicht unbedingt räumliche Proteinnachbarschaften widerspiegeln müssen. Im Vergleich zu Nachbarschaftsdaten aus Vernetzungs- und Fluoreszenzmarkierungsversuchen ergibt sich jedoch, daß die "Assembly Map" für mehrere Proteinpaare tatsächlich strukturelle Signifikanz hat (Tabelle 32).

Diese Aussage wird durch weiterführende Rekonstitutionsstudien bekräftigt. Craven et al. (1974) zeigten mittels chemischer Modifikation (Jodierung) für mehrere Proteinpaare, daß ein Protein, dessen Einbau von der Gegenwart eines anderen abhängig ist, eben dieses andere Protein in inkomplett rekonstituierten Subpartikeln gegen Jodierung schützt (Tabelle 32). Auch diese Paare sind zum Teil schon als benachbart bestimmt worden.

#### 2.2.2. Nachbarschaften an der mRNA-Bindungsstelle

Affinitätsmarkierungsstudien mit chemisch reaktiven Analoga von mRNA ergaben, daß die mRNA zumindest teilweise an der 30S Untereinheit anlagert (Tabelle 33). Am 5'-Terminus reaktives Initiationscodon AUG reagiert in der "a-site" mit S4 und S18 und in der "p-site" mit S11 und S12. In geringem

Abb. 48. Die "Assembly Map" für die Proteine der 30S Untereinheit



Bedeutung der Pfeile:

Zwischen der 16S RNS und einem Protein: Direkte Bindung des entsprechenden Proteins an die RNS.

Zwischen zwei Proteinen: Die Bindung des einen Proteins in die Untereinheit wird durch die Anwesenheit des anderen gefördert.

Dicke Pfeile: Starke Abhängigkeit.

Dünne Pfeile: Weniger starke Abhängigkeit.

Für Einzelheiten s. die Übersichtsarbeit von Nomura und Held (1974), aus der die Abbildung übernommen ist.

Tabelle 32. Protein-Protein-Wechselwirkungen, die aus Rekonstitutionsuntersuchungen zu schließen sind

| Aus der "Assembly Map" zu ersehende Wechselwirkungen +) | Aus Schutzeffekten gegen Jodierung geschlossene Wechselwirkungen ++) | Benachbart nach Vernetzungs- und Fluoreszenzmarkierungsdaten +++) |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| S2-S3                                                   | -                                                                    | S2-S3                                                             |
| S3-S5                                                   | S3-S5                                                                | -                                                                 |
| -                                                       | S3-S9                                                                | -                                                                 |
| S3-S10                                                  | -                                                                    | S3-S10                                                            |
| -                                                       | S4-S8                                                                | S4-S8                                                             |
| -                                                       | S4-S9                                                                | S4-S9                                                             |
| -                                                       | S4-S15                                                               | -                                                                 |
| -                                                       | S4-S19                                                               | -                                                                 |
| S5-S8                                                   | -                                                                    | S5-S8                                                             |
| -                                                       | S5-S10                                                               | -                                                                 |
| S5-S16                                                  | -                                                                    | -                                                                 |
| S6-S18                                                  | -                                                                    | S6-S18                                                            |
| S7-S9                                                   | S7-S9                                                                | S7-S9                                                             |
| -                                                       | S7-S15                                                               | -                                                                 |
| S7-S19                                                  | -                                                                    | -                                                                 |
| S8-S12                                                  | -                                                                    | -                                                                 |
| -                                                       | S8-S15                                                               | S8-S15                                                            |
| S8-S20                                                  | S8-S20                                                               | -                                                                 |
| S9-S10                                                  | S9-S10                                                               | -                                                                 |
| -                                                       | S10-S13                                                              | -                                                                 |
| S11-S21                                                 | -                                                                    | -                                                                 |
| S12-S16                                                 | -                                                                    | -                                                                 |
| S12-S17                                                 | -                                                                    | -                                                                 |
| -                                                       | S13-S15                                                              | -                                                                 |
| S14-S19                                                 | -                                                                    | S14-S19                                                           |
| S15-S18                                                 | -                                                                    | -                                                                 |

+ ) s. Nomura und Held, 1974; s. auch Abb. 48  
(Es sind im allgemeinen starke Wechselwirkungen berücksichtigt.)

++ ) Craven et al., 1974

+++ ) s. Abb. 21a, Tabellen 26a-c u. 29

Maße wird auch S13 markiert. Während das ebenfalls am 5'-Ende reaktive Nonsonsecodon UGA an S4 und S18 bindet, markiert AUG, dessen 3'-Terminus eine kovalente Bindung eingehen kann, neben S4 die Proteine S1 und S21 (Pongs und Lanka, 1975a, b; Pongs und Rössner, 1975; Pongs et al., 1975; zur Übersicht s. Bald et al., 1975). Ein Derivat von Poly-Thiouracil-mRNS reagiert mit S1, S18 und S21 (Fiser et al., 1974, 1975).

Die Beteiligung von S1 am mRNS-Bindungsort wird dadurch bestätigt, daß einerseits an 30S Untereinheiten gebundenes Poly-U Protein S1 gegen chemische Modifikation und Trypsinverdauung schützt (Noller et al., 1971; Acharya und Moore, 1973; Rummel und Noller, 1973) und daß andererseits S1 maximale Bindung von mRNS an das Ribosom bewirkt (van Duin und Kurland, 1970; Tal et al., 1972; van Duin und van Knippenberg, 1974; Dahlberg, 1974; Szer und Leffler, 1974; Isono und Isono, 1975; Szer et al., 1975; van Dieijen et al., 1975).

In der Nähe dieser Region sollten auch 3'- und 5'-proximale Abschnitte der 16S RNS vorliegen: 1. In 30S Untereinheiten, in denen das 3'-terminale Nukleotid der 16S RNS durch Oxydation chemisch reaktiviert ist, werden S1 und S21 kovalent an die RNS gebunden (Kenner, 1973; Czernilofsky et al., 1975). 2. S1 bindet an ein kurzes 3'-terminales Fragment der 16S RNS (Dahlberg und Dahlberg, 1975), während S4, S11 und S18 mit dem 5'-proximalen Teil wechselwirken (s. den vorhergehenden Abschnitt 2.1. dieser Diskussion und Abb. 46). 3. In der Nähe des 3'-Terminus der 16S RNS kommt eine pyrimidinreiche Sequenz vor, von der aufgrund einiger Befunde angenommen wird, daß sie bei der Initiation mit einem komplementären purinreichen Abschnitt der mRNS basenpaart. Eine derartige Sequenz ist in mehreren natürlichen mRNS-Spezies in unmittelbarer Nähe des Initiationscodons AUG nachgewiesen worden (Shine und Dalgarno, 1974, 1975a, b; Sprague und Steitz, 1975). Weiterhin wird zwischen Sequenzabschnitten des 5'-Endes der 16S RNS und dem Initiationsbereich einiger mRNS-Arten Komplementarität beobachtet, die ebenfalls das Aufstellen von Basenpaarungsmodellen erlaubt (van Knippenberg, 1975). Vor allem in diesem Fall bedarf es noch experimenteller Untersuchungen, welche die physiologische Bedeutung der Komplementarität erklären.

Berücksichtigt man die Vernetzungs- und Fluoreszenzmarkierungsergebnisse (s. Abb. 21a, Tabellen 26a-c u. 29), so werden für die Proteinpaaire S4-S12, S4-S13 und S18-S21 ihre jeweiligen Nachbarschaften am mRNS-Bindungsort bestätigt.

Die mRNA-Bindungsstelle dürfte partiell im Untereinheiten-Grenzbereich und auf dem rechten dorso-lateralen Teil der 30S Untereinheit liegen: S11, S12 und S21 sind Grenzbereichsproteine (s. Abschnitt 1.1. der Schlußdiskussion u. Tabelle 27a) und S4, S11 und S12 kommen engbenachbart in der dorso-lateralen Region vor (s. Abb. 43).

### 2.2.3. Nachbarschaften an den tRNA-Bindungsstellen

#### a. 30S-Proteine

Zur Bestimmung der an der tRNA-Bindung beteiligten Proteine sind im wesentlichen vier Methoden angewendet worden: 1. 30S Untereinheiten wurden mit N-Äthylmaleinimid (NEM) behandelt (Ginzburg et al., 1973). Die dadurch hervorgerufene Hemmung der Anlagerung von Initiations-tRNA in die "p-site" und Aminoacyl-tRNA in die "a-site" wurde auf die Modifikation eines am jeweiligen Bindungsort gelegenen Proteins - bzw. einer Gruppe von Proteinen - zurückgeführt. 2. 30S Subpartikel wurden unter Rekonstitutionsbedingungen mit einem Überschuß ribosomaler Einzelproteine inkubiert und anschließend auf ihre gesteigerte Bindungskapazität für tRNA getestet (Randall-Hazelbauer und Kurland, 1972; van Duin et al., 1972). 3. Die Untereinheiten wurden mit Fabs einzelproteinspezifischer Antikörper inkubiert (Maschler, 1973; Lelong et al., 1974). In tRNA-Bindungstesten ließ sich die Beteiligung der durch Fabs blockierten Proteine an der tRNA-Anlagerung ermitteln, wenn die Fabs eine Inhibition bewirkten. 4. Untereinheiten mit vorgebundener tRNA wurden mit Trypsin behandelt (Rummel und Noller, 1973). Für diejenigen Proteine, die durch die Anwesenheit von tRNA gegen Hydrolyse geschützt sind, wurde gefolgert, daß sie an der tRNA-Bindungsstelle liegen.

Tabelle 33 zeigt, daß 16 30S-Proteine für die tRNA-Bindung zuständig sind. Lediglich für jeweils drei Proteine sind ausschließlich "a-site"-Funktion (S8, S9, S11) bzw. "p-site"-Funktion (S5, S12, S13) nachgewiesen worden. Die übrigen Proteine (S1, S2, S3, S6, S10, S14, S18, S19, S20, S21) beeinflussen beide "sites". Infolgedessen sollten "a-" und "p-site" auf der 30S Untereinheit in starkem Maße überlappen. Bei alleiniger Berücksichtigung der Doppelfunktion von S2, S3 und S14 auf die tRNA-Anlagerung kamen van Duin et al. (1972) zu dem Schluß, daß die 30S Subpartikel eine einzige Bindungsstelle sowohl für Aminoacyl- als auch für Peptidyl-tRNA aufweisen sollte (zur Übersicht s. Kurland et al., 1972a).

Tabelle 33. 30S-Proteine an den mRNS- und tRNS-Bindungsstellen

| Protein | verantwortlich für:           |                                             |                              |                                                      |                                             |                              |                                                      |                      |
|---------|-------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------|
|         | mRNS- <sup>a</sup><br>Bindung | tRNS-Bindung in:                            |                              |                                                      |                                             |                              |                                                      |                      |
|         |                               | "a-site"                                    |                              |                                                      | "p-site"                                    |                              |                                                      | "a-" od.<br>"p-site" |
|         |                               | inhi- <sup>b</sup><br>biert<br>durch<br>NEM | stimu- <sup>c</sup><br>liert | inhi- <sup>d</sup><br>biert<br>durch<br>Fab<br>gegen | inhi- <sup>b</sup><br>biert<br>durch<br>NEM | stimu- <sup>c</sup><br>liert | inhi- <sup>d</sup><br>biert<br>durch<br>Fab<br>gegen |                      |
| S1      | +                             | +                                           |                              | +                                                    |                                             |                              | +                                                    | +                    |
| S2      |                               |                                             | +                            |                                                      |                                             | +                            | +                                                    |                      |
| S3      |                               |                                             | +                            | +                                                    |                                             | +                            | +                                                    | +                    |
| S4      | +                             |                                             |                              |                                                      |                                             |                              |                                                      |                      |
| S5      |                               |                                             |                              |                                                      |                                             |                              | +                                                    |                      |
| S6      |                               |                                             |                              |                                                      |                                             |                              | +                                                    | +                    |
| S7      |                               |                                             |                              |                                                      |                                             |                              |                                                      |                      |
| S8      |                               |                                             |                              | +                                                    |                                             |                              |                                                      |                      |
| S9      |                               |                                             |                              | +                                                    |                                             |                              |                                                      |                      |
| S10     |                               |                                             |                              | +                                                    |                                             |                              | +                                                    |                      |
| S11     | +                             |                                             |                              | +                                                    |                                             |                              |                                                      |                      |
| S12     | +                             |                                             |                              |                                                      |                                             |                              | +                                                    |                      |
| S13     | +                             |                                             |                              |                                                      |                                             |                              | +                                                    |                      |
| S14     |                               | +                                           | +                            | +                                                    |                                             | +                            | +                                                    | +                    |
| S15     |                               |                                             |                              |                                                      |                                             |                              |                                                      |                      |
| S16     |                               |                                             |                              |                                                      |                                             |                              |                                                      |                      |
| S17     |                               |                                             |                              |                                                      |                                             |                              |                                                      |                      |
| S18     | +                             |                                             |                              | +                                                    | +                                           |                              |                                                      | +                    |
| S19     |                               |                                             |                              | +                                                    |                                             |                              | +                                                    | +                    |
| S20     |                               |                                             |                              | +                                                    |                                             |                              | +                                                    |                      |
| S21     | +                             | +                                           |                              | +                                                    |                                             |                              | +                                                    | +                    |

<sup>a</sup> Bald et al., 1975; Pongs und Lanka, 1975a, b; Pongs und Rössner, 1975; Pongs et al., 1975; Fiser et al., 1974, 1975

<sup>b</sup> Ginzburg et al., 1973

<sup>c</sup> Randall-Hazelbauer und Kurland, 1972; van Duin et al., 1972

<sup>d</sup> Maschler, 1973; Lelong et al., 1974

<sup>e</sup> Rummel und Noller, 1973



Die Vielzahl der für die tRNS-Bindung verantwortlichen Proteine kann durch folgende Tatsachen erklärt werden:

1. Die tRNS ist mit ca. 70Å Länge und ca. 20Å Dicke im Verhältnis zum Ribosom ein großes Molekül (Kim et al., 1974; Robertus et al., 1974) und könnte somit mit einem beträchtlichen Teil der Ribosomenoberfläche in Kontakt treten.
2. Bei allen Untersuchungen war gleichzeitig die Bindung von mRNS an das Ribosom beteiligt. Deshalb sollten die Daten zusätzlich die Proteinkomposition der mRNS-Bindungsstelle widerspiegeln; denn mRNS- und tRNS-Bindungsregion müssen zwar nicht identisch sein, sich aber aufgrund der Interaktion zwischen mRNS und tRNS bei der Codon-Anticodon-Erkennung teilweise überschneiden. In der Tat ist für alle mRNS-Bindungsproteine (außer S4) aus Tabelle 31 zu ersehen, daß sie auch bei der tRNS-Anlagerung involviert sind. Ein Beitrag von S4 an der tRNS-Bindung kann aus genetischen Untersuchungen geschlossen werden: Ribosomen resistenter Mutanten gegen Kasugamycin - ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das die Bindung der Initiations-tRNS in die "p-site" verhindert (Helser et al., 1971) - enthalten ein verändertes Protein S4 (Zimmermann et al., 1973). Nach anderen Studien kann eine Veränderung auch in S2 (Okuyama et al., 1974) oder in der 16S RNS (Helser et al., 1971, 1972) auftreten.
3. Außer bei den Trypsinverdauungsexperimenten wurde bei allen Studien jeweils faktorenabhängige tRNS-Bindung untersucht. Es ist folglich zu berücksichtigen, daß die Resultate auch Aussagen über die Faktorenbindungsstellen einschließen. Für den Faktor IF2, der die Anlagerung des Peptidyl-tRNS-Analogons fMet-tRNS bedingt, ist aus Vernetzungsstudien bereits bekannt, daß er auf der 30S Untereinheit an die für tRNS-Bindung zuständigen Proteine S1, S2, S11, S12, S13, S14 und S19 zu koppeln ist (s. Tabelle 26f). Direkte Evidenzen für eine Wechselwirkung von 30S Untereinheiten mit EF-Tu, von dem die Aminoacyl-tRNS-Anlagerung abhängig ist, liegen noch nicht vor. Da jedoch IF2 und EF-Tu mit großer Wahrscheinlichkeit einen identischen Bindungsort auf der 50S Subpartikel undissoziierter 70S Ribosomen haben (s. Abschnitt 2.2.6. der Schlußdiskussion), ist anzunehmen, daß EF-Tu ebenfalls auf der 30S Untereinheit die IF2-Bindungsstelle besetzen könnte. An dieser Stelle sollte im übrigen auch IF3 mit dem Ribosom wechselwirken. Zusätzlich zu den Proteinen, die mit IF2 zu vernetzen sind, wird IF3 noch mit S18 und S21 verknüpft (s. Tabelle 26f).

Mittels Vernetzungs- und Fluoreszenzmarkierungsversuchen ließen sich für folgende Proteine der tRNS-Bindungsregion engbenachbarte Anordnungen

bestimmen (s. Abb. 21a, Tabellen 26a-c u. 29): S2-S3, S2-S5, S2-S8, S3-S4, S3-S10, S4-S5, S4-S6, S4-S8, S4-S9, S4-S12, S4-S13, S4-S20, S5-S8, S5-S9, S6-S18, S13-S19, S13-S20, S18-S21. Diese Vielzahl von Paaren benachbarter Proteine spiegelt noch einmal die komplexe Zusammensetzung und folglich auch eine beträchtliche Größe der Bindungsregion wider, die unter Berücksichtigung einiger Proteinortsangaben zum Teil in der "Kopf- und Halsregion" der 30S Untereinheit liegen dürfte (s. Abb. 43). Mit den Proteinen S9, S10, S11, S12, S14, S20 und S21 kann diese Region auch teilweise dem Untereinheiten-Grenzbereich zugeordnet werden (s. Tabelle 27a).

### b. 50S-Proteine

Die tRNS-Bindungsorte auf der 50S Untereinheit sind ebenfalls partiell an der 30S-50S-Kontaktstelle gelegen. Unter den tRNS-Bindungsproteinen befinden sich L11, L14 und L27, die direkt im "50S-Sitzbereich" lokalisiert wurden, an jenem Strukturmerkmal also, das bekanntlich in undissoziierten 70S Ribosomen Teil des Grenzbereiches ist (s. Abb. 44 u. 45 und Abschnitt 1.1.e der Schlußdiskussion).

Die an der tRNS-Anlagerung beteiligten 50S-Proteine wurden in Affinitätsmarkierungsstudien unter Verwendung von tRNS-Analoga bestimmt, die in ihrem Aminosäurerest chemisch reaktiv oder aktivierbar sind (zur Übersicht s. Cantor et al., 1974a). Tabelle 34 verdeutlicht, daß - je nach gewählter reaktiver Gruppe - in der "p-site" gebundene Initiations- oder Aminoacyl-tRNS die Proteine L2, L11, L14, L15, L16, L18 und L27 markiert (Czernilofsky et al., 1974a, b; Hauptmann et al., 1974; Hsiung et al., 1974; Oen et al., 1973, 1974; Pellegrini et al., 1974; Sopori et al., 1974). L16 und - in geringerem Maße - L2 und L27 werden darüber hinaus auch von Aminoacyl-tRNS erreicht, die in der "a-site" vorliegt (Eilat et al., 1974a).

Mit Hilfe von tRNS-Molekülen, die unterschiedlich lange Peptidylreste aufweisen, konnte die nähere Umgebung des Ortes vermessen werden, mit dem der 3'-Terminus von tRNS in der "p-site" wechselwirkt (Eilat et al., 1974b). tRNS, die lediglich mit einem Aminoacylrest beladen ist - dem kürzesten Peptidylrest also - markiert am stärksten L2. Durch jeweils längere Peptidylreste werden in steigendem Maße L27, L32 oder L33 und schließlich L24 modifiziert.

Auch die Untersuchungen an 50S Subpartikeln zeigen, daß "a-" und "p-site" weitgehend überlappend oder sogar identisch sein dürften. Dieser

Befund läßt das bisher allgemein verwendete Denkmodell für das Ribosom mit zwei räumlich getrennten tRNS-Bindungsarten in Zweifel ziehen. Es bleibt abzuwarten, ob weitere Ergebnisse die Annahme bestätigen, nach der die Unterscheidung zwischen beiden "sites" im wesentlichen funktionsbezogen ist.

### c. rRNS

Das Vorliegen von rRNS an der tRNS-Bindungsregion wird neben der Tatsache, daß mehrere Proteine, die die tRNS-Anlagerung an das Ribosom bedingen, auch mit 16S, 23S oder 5S RNS wechselwirken (S1, S6, S8, S13, S19, S20, L16, L18 und L24; s. Abschnitt 2.1. der Schlußdiskussion), vor allem durch folgende Befunde belegt: 1. In der "p-site" gebundene Aminoacyl-tRNS, die in einem Nukleotid des 5'-proximalen Abschnitts chemisch reaktiv ist, markiert ausschließlich 16S RNS (Schwartz und Ofengand, 1974). Ebenfalls in der "p-site" vorliegende tRNS mit reaktivem Aminoacylrest modifiziert 23S RNS (Bispink und Mattheaei, 1973; Barta et al., 1975). 2. Modifikation der 16S RNS im Ribosom mit Kethoxal führt zur Inhibition der tRNS-Bindung (Noller und

Tabelle 34. SOS-Proteine an den tRNS-Bindungsstellen

| Protein | verantwortlich für tRNS-Bindung in: |                       |
|---------|-------------------------------------|-----------------------|
|         | "a-site" <sup>a</sup>               | "p-site" <sup>b</sup> |
| L2      | (+)                                 | +                     |
| L11     |                                     | +                     |
| L14     |                                     | +                     |
| L15     |                                     | +                     |
| L16     | +                                   | +                     |
| L18     |                                     | +                     |
| L24     |                                     | +                     |
| L27     | (+)                                 | +                     |
| L32/L33 |                                     | +                     |

<sup>a</sup> Eilat et al., 1974a

<sup>b</sup> Czernilofsky et al., 1974a, b; Hauptmann et al., 1974; Hsiung et al., 1974; Oen et al., 1973, 1974; Pellegrini et al., 1974; Sopori et al., 1974; zur Übersicht s. Cantor et al., 1974a

Chaires, 1972). 3. L2, L18, (L6 und L25) bewirken die Bindung von 5S RNS an 23S RNS (Gray und Monier, 1972). 4. Von "a-site"-gebundener Aminoacyl-tRNS interagiert ein Tetranukleotid (GTTC) mit einer komplementären Sequenz der 5S RNS (GAAC) (Erdmann et al., 1973; Richter et al., 1973). 5. Ribosomen kasugamycinresistenter Mutanten weisen unter anderem im Vergleich zu Wildtypribosomen unterschiedlich methylierte 16S RNS auf (Helser et al., 1971, 1972).

#### 2.2.4. Nachbarschaften an der "Fidelity Gruppe"

In der sogenannten "Fidelity Gruppe" werden diejenigen ribosomalen Komponenten zusammengefaßt, die für die Lesegenauigkeit bei der Translation ("Fidelity") zuständig sind. Zur Ermittlung dieser Komponenten wurden am Ribosom Wirkungsmechanismus, Wirkungsort und Bindungsstelle im wesentlichen für das Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycin bestimmt, das die Übersetzungsgenauigkeit durch Induktion von "Misreading" herabsetzt. Da die Translation Codon-Anticodon-Wechselwirkung einschließt, ist von vornherein anzunehmen, daß einige Proteine, die für mRNS- und tRNS-Anlagerung an das Ribosom verantwortlich sind, die "Fidelity" in einer Gruppe engbenachbarter Proteine beeinflussen. In der Tat fungieren alle Proteine der "Fidelity Gruppe" (S3, S4, S5, S6, S11 und S12) auch als mRNS- und/oder tRNS-Bindungsproteine (s. Tabelle 33).

Anhand der im Folgenden beschriebenen Befunde zeigt sich beispielhaft die gegenseitige Ergänzung von Funktions- und Strukturstudien, um die Organisation eines Funktionszentrums im Ribosom aufzuklären:

Rekonstitutionsversuche, bei denen jeweils ein ribosomales Einzelprotein dem Inkubationsgemisch fehlt, ergaben, daß S11 und S12 die "Fidelity" antagonistisch beeinflussen und deuteten somit auf die Nachbarschaft dieser beiden Proteine im Ribosom (Nomura et al., 1969; Ozaki et al., 1969). Weglassen von S12 führt zur Rekonstitution von 30S Subpartikeln, die, verglichen mit vollständig rekonstituierten Untereinheiten, in Gegenwart von Streptomycin eine erhöhte Lesegenauigkeit bewirken. Partikel ohne S11 rufen dagegen eine stark erhöhte "Misreading"-Rate hervor.

Untersuchungen an ribosomalen Mutanten mit verändertem Verhalten gegen Streptomycin zeigten, daß S12, S4 und S5 gemeinsam den Wirkungsort dieses Antibiotikums kontrollieren und ließen dadurch auf die benachbarte Anordnung

der drei Proteine schließen: 1. Streptomycinresistenz und -abhängigkeit werden jeweils durch eine Veränderung in S12 verursacht (Birge und Kurland, 1969; Nomura et al., 1969; Ozaki et al., 1969; Funatsu und Wittmann, 1972; Funatsu et al., 1972a). 2. "Revertanten" von Streptomycinabhängigkeit zu -unabhängigkeit weisen anstatt einer Rückmutation in S12 eine Veränderung in S4 oder S5 auf (Birge und Kurland, 1970; Deusser et al., 1970; Kreider und Brownstein, 1971, 1972; Stöffler et al., 1971c; Donner und Kurland, 1972; Funatsu et al., 1972c; Hasenbank et al., 1973; Itoh und Wittmann, 1973). 3. Ribosomen aus ram-(ribosomal ambiguity-)Mutanten mit dem veränderten Genprodukt S4 führen zu entsprechenden "Misreading"-Effekten wie Wildtypribosomen in Gegenwart von Streptomycin (Bjare und Gorini, 1971; Zimmermann et al., 1971; Hasenbank et al., 1973; zur Übersicht s. Gorini, 1974).

Nach Ergebnissen aus partiellen Rekonstitutionsversuchen und Affinitätsmarkierungsexperimenten sollten Wirkungsort und Bindungsstelle für Streptomycin sich wenigstens teilweise überlappen. Es wurde gezeigt, daß zum einen S5 und S3 im Ribosom zur Streptomycinbindung vorliegen müssen (Schreiner und Nierhaus, 1973) und zum anderen S4 durch ein chemisch reaktives Analogon des Antibiotikums markiert wird (Pongs und Erdmann, 1973; Erdmann und Reinwald, in Vorbereitung).

An der Streptomycin-Bindungsstelle dürfte auch 16S RNS vorliegen; Streptomycin kann unter gewissen Bedingungen mit 16S RNS wechselwirken (Garvin et al., 1974; s. dazu auch Schreiner und Nierhaus, 1973).

Hinweise für eine Beteiligung von S6 an der Lesegenauigkeit wurden durch die Untersuchung resistenter Mutanten gegen Kanamycin und Neomycin gewonnen, die ebenso wie Streptomycin Aminoglykosid-Antibiotika sind und in vitro "Misreading" induzieren (Davies et al., 1965; Tanaka et al., 1967): Ribosomen kana- und neomycinresistenter Zellen besitzen ein verändertes Protein S6 (Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974).

Resultate immunologischer Untersuchungen sind mit den zuvor erwähnten nicht in Übereinstimmung. Fabs von Antikörpern gegen sieben Proteine (S1, S10, S11, S18, S19, S20 und S21) inhibieren die Anlagerung von Streptomycin an das Ribosom (Maschler, 1973; Lelong et al., 1974). Dieser Befund spiegelt auf den ersten Blick eine äußerst komplex organisierte Bindungsstelle wider, deren anzunehmendes Ausmaß in Relation zu einem derart kleinen Molekül wie



Streptomycin mit einem Molekulargewicht von ca. 500 Dalton aber erstaunlich erscheint. Da aufgrund kürzlich nachgewiesener unspezifischer Wechselwirkungen, die bei den von den Autoren gewählten Bedingungen zwischen Antiotika und Antikörpern auftreten können (Wienen und Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse), diese Resultate nur bedingte Aussagekraft besitzen, können - außer S11 - die mittels der immunologischen Methode bestimmten Proteine nicht eindeutig der "Fidelity Gruppe" mit S3, S4, S5, S6, S11 und S12 zugerechnet werden.

Struktureller Nachweis für die benachbarte Anordnung von S4, S5, S6, S11 und S12 wurde mittels der Immunelektronenmikroskopie erbracht (s. Abb. 43). Diese Proteine und somit auch die "Fidelity Gruppe" sind der rechten dorso-lateralen Seite sowie der angrenzenden Rückenregion der 30S Untereinheit zuzuordnen. Die Nachbarschaft einiger dieser Proteine wird durch die Vernetzungsprodukte S3-S4, S4-S5 und S4-S12 belegt.

Die mit den Aminoglykosiden Kasugamycin und Spectinomycin angestellten Untersuchungen können bei der Besprechung der "Fidelity Gruppe" nicht berücksichtigt werden, weil diese beiden Antibiotika kein "Misreading" verursachen (zur Übersicht s. Vasquez, 1974). Dennoch ist anzunehmen, daß Wirkungs- und Bindungsort von Spectinomycin in unmittelbarer Umgebung dieser Region liegt: Ribosomen spectinomycinresistenter Zellen weisen als verändertes Genprodukt Protein S5 auf (Bollen et al., 1969; Dekio und Takata, 1969; Bollen und Herzog, 1970; Dekio et al., 1970; Funatsu et al., 1971, 1972b; De Wilde und Wittmann-Liebold, 1973).

#### 2.2.5. Nachbarschaften am Peptidyltransferase-Zentrum

Als Komponenten des Peptidyltransferase-Zentrums sind diejenigen ribosomalen Proteine anzusehen, die in der 50S Untereinheit die Faktoren- und GTP-unabhängige Transpeptidierung bedingen. Bei dieser Reaktion wird der Peptidylrest "p-site"-gebundener tRNS an den Aminoacylrest der tRNS in der "a-site" übertragen.

Erste Informationen über die Proteinzusammensetzung dieser Region konnten mit Hilfe partieller Rekonstitutionsexperimente gewonnen werden. An "50S Core Partikel" wurden in bestimmten Kombinationen "Split Proteine" rückgebunden und die resultierenden Partikel in der sogenannten "Fragment Reaktion" in Gegenwart eines Peptidylrestes sowie von Puromycin und Alkohol



auf ihre Transpeptidierungskapazität untersucht (Monro, 1971). Nierhaus und Montejo (1973) und Dietrich et al. (1974) zeigten, daß im wesentlichen die Gegenwart von L11 in der 50S Untereinheit für den Peptidyltransfer verantwortlich ist und L16 und L6 (jeweils nur in Anwesenheit von L11) diese Aktivität verstärken.

Dieser Befund wird durch kürzlich veröffentlichte Daten entweder nicht oder nur teilweise bestätigt. Während Ballesta und Vasquez (1974) und Howard und Gordon (1974) eine Beteiligung von L11 ausschlossen, wiesen Noller und Mitarbeiter (Moore et al., 1975) nach, daß allein L16 die Transferase-Aktivität bedingt. Obwohl diese unterschiedlichen Resultate bisher nicht in Einklang zu bringen und infolgedessen die Aussagen dieser Versuche noch mit einer Unsicherheit behaftet sind, wird die Involvierung von L6, L11 und L16 in der Peptidyltransferase-Reaktion - und somit ihre Nachbarschaft - durch ihre gemeinsame Zuständigkeit für die Bindung des Transferase-Inhibitors Chloramphenicol bekräftigt (Nierhaus und Nierhaus, 1973; Dietrich et al., 1974). Vorliegen von L16 und (in geringem Maße) von L11 im Ribosom bewirkt die Anlagerung des Antibiotikums an das Ribosom. L6, das in der 50S Untereinheit selbst keine Affinität für Chloramphenicol aufweist, stimuliert die Wirkung von L16.

Die Bestimmung der Bindungsorte für Antibiotika, welche die Peptidyltransferase hemmen, erbrachte unterstützende sowie weiterführende Befunde. Affinitätsmarkierungsstudien zeigten, daß chemisch reaktive Analoga von Chloramphenicol L2, L16, L27 (und S3) und Derivate von Puromycin L2, L6 (und S14) sowie 23S RNS und/oder 5S RNS markieren (Pongs et al., 1973a, b; Sonenberg et al., 1973; Harris et al., 1973).

Die Anlagerungsstelle für Erythromycin, das ebenfalls ein Transferase-Hemmer ist, wurde in Antikörperbindungsstudien ermittelt. Unter Versuchsbedingungen, bei denen keine unspezifischen Reaktionen zwischen Antibiotikum und Antikörpern auftreten, verhindern bzw. behindern Fabs gegen L2, L4, L10, L11, L15 und L18 die Wechselwirkung zwischen Erythromycin und Ribosom (Wienen, Stöffler und Pestka, unveröffentlichte Ergebnisse). Genetische Studien lassen überdies auf eine Beteiligung von L22 an der Peptidyltransferase schließen; Ribosomen erythromycinresistenter Mutanten sind entweder in L22 oder L4 verändert (Wittmann et al., 1973).

Immunologische Untersuchungen der Peptidkettentermination ergaben Evidenzen

für die Beteiligung von L11 und L16 an der Peptidyltransferase (Tate et al., 1975). Die Blockierung von L11 und/oder L16 durch entsprechende Fabs führt zur Inhibition der Transferase und somit zur Verhinderung der RF-abhängigen Terminationsreaktion.

Schließlich wird die Proteinanordnung an der Peptidyltransferase auch durch die zuvor erwähnten Resultate über die tRNS-Bindungsregion auf der 50S Untereinheit wiedergegeben (s. Tabelle 34 und den vorhergehenden Abschnitt 2.2.3.b). Die bei den Affinitätsmarkierungsversuchen gewählten reaktiven Gruppen sind durchweg Teil der Aminoacyl- oder Peptidylreste der tRNS-Moleküle und gehen deshalb auf dem Ribosom sehr wahrscheinlich mit einem Ort in unmittelbarer Nähe der Transferase eine kovalente Bindung ein. Peptidyltransferase, "a-" und "p-site" sollten deshalb auf der 50S Subpartikel stark überschneidende oder sogar identische Bereiche einnehmen, in denen zusammengefaßt folgende Proteine angeordnet sein dürften: L2, L4, L6, L10, L11, L14, L15, L16, L18, L22, L24, L27 und L32/L33. Zumindest Teile dieser Funktionszentren können dem "50S-Sitz" und dessen Umgebung zugeordnet werden; mehrere der aufgeführten Proteine wurden dort lokalisiert (s. Abb. 44).

#### 2.2.6. Nachbarschaften an den Faktorenbindungsstellen und am GTPase-Zentrum

Wie bereits ausgeführt, ergaben Vernetzungsexperimente, daß die Initiationsfaktoren IF2 und IF3 zumindest partiell an den tRNS-Bindungsstellen bzw. deren Umgebung mit der 30S Untereinheit interagieren (s. Abschnitt 2.2.3.a der Schlußdiskussion): IF2 ist mit S1, S2, S11, S12, S13, S14 und S19 zu verknüpfen und IF3 mit S1, S11, S12, S13, S14, S18, S19 und S21 (Bollen et al., 1975; Hawley et al., 1974; weiterhin zitiert in Traut et al., 1974, und Bollen et al., 1975; s. Tabelle 26f). Kürzlich durchgeführte Untersuchungen ergaben für IF3 außerdem, daß er zum einen mittels Tartryldiazid an S7 und zum anderen an den durch Oxydation reaktivierten 3'-Terminus der 16S RNS zu koppeln ist (van Duin et al., 1975). Letzteres Ergebnis sowie die Tatsache, daß fast alle der oben aufgeführten Proteine an die 16S RNS binden (s. Abb. 46), läßt auf die Anordnung von 16S RNS am Bindungs-ort für die Initiationsfaktoren schließen.

Für IF2 ist bekannt, daß er ebenso wie die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G sowie die Releasefaktoren RF1 und RF2 an die 50S Untereinheit bindet. Partielle Rekonstitutionsversuche und Antikörperbindungsexperimente zeigten, daß für die Anlagerung aller Faktoren an das Ribosom und die von ihnen

jeweils abhängige GTP-Hydrolyse die Proteine L7/L12 zuständig sind (Kischa et al., 1971; Brot et al., 1972, 1974; Hamel et al., 1972; Sander et al., 1972; Weissbach et al., 1972; Fakunding et al., 1973; Highland et al., 1973, 1974a, b; Kay et al., 1973; Lockwood et al., 1974; Stöffler et al., 1974; Tate et al., 1975). Darüber hinaus hemmt vorgebundener EF-G die Anlagerung von EF-Tu (und vice versa) (Cabrer et al., 1972; Miller, 1972; Richman und Bodley, 1972; Richter, 1972; Modolell und Vasquez, 1973). Alle Faktoren dürften demnach auf der 50S Subpartikel bei L7/L12 jeweils überschneidende oder sogar sich völlig überlappende Bindungsorte haben. Die Anordnung von L7/L12 an dieser Stelle wird überdies durch seine Vernetzbarkeit mit EF-G belegt (Acharya et al., 1973; s. Tabelle 26f).

In der Nähe von L7/L12 sollten aufgrund folgender Resultate die Proteine L4, L5, L6, L10, L11, L13, L18, L25 und L30 angeordnet sein:

1. Die Anwesenheit von L6, L10 und L11 in "Core Partikeln" der 50S Untereinheit bedingt die Bindung von L7/L12 (Schrier et al., 1973; Highland und Howard, 1975).
2. Die Blockierung von L6, L10 und L18 auf der Oberfläche von "50S Core Partikeln" durch die jeweiligen Antikörper inhibiert die Anlagerung von L7/L12 (Stöffler et al., 1974).
3. Anti-L4 verhindert neben Anti-L7/L12 die Bindung von EF-Tu an die große Untereinheit und damit die EF-Tu-abhängige GTP-Hydrolyse (Highland et al., 1974b).
4. L5 und L11 bilden den Bindungs- und Wirkungsort für das Antibiotikum Thiostrepton, das als Translokationshemmer (zur Übersicht s. Vasquez, 1974) die Interaktion zwischen 50S Untereinheiten und IF2, EF-Tu bzw. EF-G inhibiert (Highland et al., 1971; Modolell et al., 1971; Ballesta und Vasquez, 1972; Grunberg-Manago et al., 1972; Naaktgeboren et al., 1975). Antikörper gegen L11 blockieren die Anlagerung von Thiostrepton (Highland et al., 1975), und Ribosomen resistenter Mutanten gegen Thiopeptin - ein Thiostrepton in Struktur und Wirkung verwandtes Antibiotikum - weisen ein verändertes Protein L5 auf (Liou et al., 1975).
5. Affinitätsmarkierungsversuche mit chemisch reaktivem GDP, das in Gegenwart von EF-G an die 50S Untereinheit gebunden wird, ergaben, daß dieses GTP-Analogon mit L5, L11, L13, L18 und L30 reagiert (Maassen und Möller, 1974).
6. Ein aus *Bacillus stearothermophilus* und *E. coli* Ribosomen isolierter 5S RNS-Protein-Komplex weist (elongationsfaktorenunabhängige) GTPase-

(und ATPase-) Aktivität auf (Horne und Erdmann, 1972, 1973; Gaunt-Klöpfer und Erdmann, 1975). Der *B. stearothermophilus*-Komplex enthält die den *E. coli*-Proteinen entsprechenden Proteine L5 und L18 und wird in seiner enzymatischen Aktivität durch die Translokationsinhibitoren Thiostrepton und Fusidinsäure gehemmt. Der *E. coli*-Komplex setzt sich aus L18 und L25 zusammen, wird aber in seiner Funktion durch keins der beiden Antibiotika inhibiert.

Die Kenntnis der Positionen mehrerer Proteine auf der 50S-ribosomalen Oberfläche erlaubt die Zuordnung des gemeinsamen Zentrums für Faktorenbindung und GTPase zur mittleren Protuberanz der 50S Untereinheit sowie zur "Sitz-region" und deren unmittelbarer Umgebung (s. Abb. 44). Aufgrund überlappen-der Proteinkompositionen, welche dieser Funktionsort, die tRNS-Bindungsstellen und die Peptidyltransferase aufweisen (s. Tabelle 34 und die vorhergehenden Abschnitte 2.2.3.b und 2.2.5.), sollte der Schluß zulässig sein, daß in dieser Region der 50S Untereinheit - bezogen auf das undissoziierte 70S Ribosom also im Untereinheiten-Grenzbereich - einige der hauptsächlichlichen ribosomalen Funktionszentren angeordnet sind.

### 3. Schlußbetrachtung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit verschiedenen Methoden Ergebnisse zu erbringen, die einen Beitrag zur Aufklärung der dreidimensionalen Organisation der Proteine im *E. coli*-Ribosom leisten. Die Kombination der Aussagen, welche die Antikörperbindungsstudien, die Vernetzungsexperimente mit bifunktionellen Reagenzien und die immunelektronenoptischen Versuche zulassen, erwiesen sich als äußerst nutzbringend. Die Bedeutung des eingeschlagenen Weges zeigt sich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß mittels Röntgenstrukturanalyse erst einige anfängliche Untersuchungen am Ribosom durchgeführt werden konnten (Paradies et al., 1974): Aufgrund der Komplexität des Ribosoms gelang es bisher nicht, Kristalle in ausreichender Güte zu gewinnen, um diese Technik anzuwenden, die sich bei der Strukturaufklärung einfach organisierter Makromoleküle mehrfach in hervorragender Weise bewährt hat (zur Übersicht s. Liljas und Rossmann, 1974).

Unter Berücksichtigung der Ortsangaben für mehrere Proteine auf der Ribosomenoberfläche und die Literaturdaten über die Beteiligung von engbenachbarten Proteinen an bestimmten ribosomalen Teilfunktionen waren einige über die Struktur hinausgehende Folgerungen möglich: Es konnten erste

Struktur-Funktionszuordnungen auf dreidimensionalem Niveau vorgenommen werden.

Kürzlich wurden von mehreren Arbeitsgruppen vorläufige Ribosomenmodelle präsentiert (Morgan und Brimacombe, 1973; Bollen et al., 1974; Pongs et al., 1974; Traut et al., 1974). Außer Traut et al. gingen die Autoren entweder nur auf strukturelle oder funktionelle Resultate ein. Bedingt durch die Wahl der teils unterschiedlichen Ergebnisse, welche die Arbeitsgruppen in ihre Überlegungen einbezogen, sind Übereinstimmungen zum einen zwischen den einzelnen Modellen und zum anderen zwischen den Modellen und den Organisationsdaten der vorliegenden Arbeit nur partiell zu beobachten. Der Hauptgrund dafür sollte in folgendem zu finden sein: Die von den genannten Gruppen zugrunde gelegte Voraussetzung, daß alle ribosomalen Proteine in situ globulär sind, ist mit Sicherheit unzutreffend. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, weisen zumindest einige Proteine eine gestreckte Konformation auf.

Die gegenwärtig noch unzureichende Kenntnis über die Form der Proteine sowie die noch nicht vollständigen Ortsangaben für alle Proteine könnten auch einige der in dieser Arbeit getroffenen Folgerungen über die strukturelle und funktionelle Organisation des Ribosoms einschränken. Bei Beachtung weiterführender Ergebnisse ist jedoch zu erwarten, daß in naher Zukunft der dreidimensionale Aufbau des Ribosoms in einem verbindlichen Modell zusammengefaßt werden kann.

G. Literaturverzeichnis

(s. auch Nachtrag auf S.292 )

- Acharya, A. S., P. B. Moore, J. Mol. Biol., 76, 207 (1973).
- Acharya, A. S., P. B. Moore, F. M. Richards, Biochemistry, 12, 3108 (1973).
- Allet, B., P. F. Spahr, Eur. J. Biochem., 19, 250 (1971).
- Amelunxen, F., Cytobiologie, 3, 111 (1971).
- Amzel, L. M., R. J. Poljak, F. Saul, J. M. Varga, F. F. Richards, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 1427 (1974).
- Anderson, T. F., W. M. Stanley, J. Biol. Chem., 139, 339 (1941).
- Anderson, T. F., N. Yamamoto, K. Hummeler, J. Appl. Physiol., 32, 1639 (1961).
- Anderson, W. F., L. Bosch, F. Gros, M. Grunberg-Manago, S. Ochoa, A. Rich, Th. Staehelin, FEBS Letters, 48, 1 (1974).
- Arnon, R., Current Topics in Microbiology and Immunology, 54, 47 (1971).
- Atsmon, A., P. Spitnik-Elson, D. Elson, J. Mol. Biol., 25, 161 (1967).
- Bakardjieva, A., R. R. Crichton, Biochem. J., 143, 599 (1974).
- Bald, R., E. Lanka, O. Pongs, Slovak. Acad. Sci., im Druck (1975).
- Ballesta, J. P. G., V. Montejo, F. Hernández, D. Vasquez, Eur. J. Biochem., 42, 167 (1974).
- Ballesta, J. P. G., D. Vasquez, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 69, 3058 (1972).
- Ballesta, J. P. G., D. Vasquez, FEBS Letters, 48, 266 (1974).
- Barritault, D., A. Expert-Bezançon, M. Milet, D. H. Hayes, FEBS Letters, 50, 114 (1975).
- Barritault, D., A. Expert-Bezançon, Abstracts of symposia, colloquia and postercontributions presented at the tenth meeting of the Federation of European Biochemical Societies in Paris, July 1975, Abstract No. 442.
- Barta, A., E. Küchler, C. Branlant, J. Sriwidada, A. Krol, J.-P. Ebel, FEBS Letters, 56, 170 (1975).
- Beaudet, A. L., C. T. Caskey, in: The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation, Herausg.: L. Bosch, Frontiers of Biology, North-Holland Publ. Co. (Amsterdam, London), 27, 133 (1972).



- Benjamini, E., D. Michaeli, J. D. Young, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 58, 85 (1972).
- Benkov, K., N. Delihay, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 60, 901 (1974).
- Benveniste, R., J. Davis, *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 471 (1973).
- Bickle, T. A., J. W. B. Hershey, R. R. Traut, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 1327 (1972).
- Birge, E. A., C. G. Kurland, *Science*, 166, 1282 (1969).
- Birge, E. A., C. G. Kurland, *Mol. Gen. Genet.*, 109, 356 (1970).
- Bispink, L., H. Matthaei, *FEBS Letters*, 37, 291 (1973).
- Bitar, K. G., *Biochim. Biophys. Acta*, 386, 99 (1975).
- Bitar, K. G., B. Wittmann-Liebold, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 1343 (1975).
- Bjare, U., L. Gorini, *J. Mol. Biol.*, 57, 423 (1971).
- Blake, A., A. R. Peacocke, *Nature*, 208, 1319 (1965).
- Bode, U., L. C. Lutter, G. Stöffler, *FEBS Letters*, 45, 232 (1974).
- Bollen, A., R. J. Cedergren, D. Sankoff, G. Lapalme, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59, 1069 (1974).
- Bollen, A., J. Davis, M. Ozaki, S. Mizushima, *Science*, 165, 85 (1969).
- Bollen, A., R. L. Heimark, A. Cozzzone, R. R. Traut, J. W. B. Hershey, L. Kahan, *J. Biol. Chem.*, 250, 4310 (1975).
- Bollen, A., A. Herzog, *FEBS Letters*, 6, 69 (1970).
- Branlant, C., A. Krol, J. Sriwidada, J.-P. Ebel, P. Sloof, R. A. Garrett, *FEBS Letters*, 52, 195 (1975).
- Branlant, C., A. Krol, J. Sriwidada, P. Fellner, R. Crichton, *FEBS Letters*, 35, 265 (1973).
- Brenner, S., R. W. Horne, *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 103 (1959).
- Brosius, J., E. Schiltz, R. Chen, *FEBS Letters*, 56, 359 (1975).
- Brot, N., W. P. Tate, C. T. Caskey, H. Weissbach, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 89 (1974).
- Brot, N., E. Yamasaki, B. Redfield, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.*, 148, 148 (1972).

- Brownlee, G. G., S. Sanger, B. G. Barrell, *J. Mol. Biol.*, 34, 379 (1968).
- Bruskov, V. J., N. A. Kiselev, *J. Mol. Biol.*, 37, 367 (1968).
- Burgess, R. R., *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 711 (1971).
- Cabrer, B., D. Vasquez, J. Modolell, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 733 (1972).
- Cantor, C. R., K. Huang, R. Fairclough, in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 587 (1974a).
- Cantor, C. R., M. Pellegrini, H. Oen, in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 573 (1974b).
- Caskey, C. T., in: *Advances in Protein Chemistry*, Herausg.: C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, Academic Press (New York, London), 27, 243 (1973).
- Caskey, C. T., Ph. Leder, K. Moldave, D. Schlessinger, *Science*, 176, 195 (1972).
- Celada, F., R. Strom, *Quart. Rev. Biophys.*, 5, 395 (1972).
- Chamberlin, M., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 35, 851 (1970).
- Chang, F. N., *J. Mol. Biol.*, 78, 563 (1973).
- Chang, F. N., J. G. Flaks, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 67, 1321 (1970).
- Chang, F. N., J. G. Flaks, *J. Mol. Biol.*, 61, 387 (1971).
- Chang, F. N., J. G. Flaks, *J. Mol. Biol.*, 68, 177 (1972).
- Chen, R., L. Mende, U. Arfsten, *FEBS Letters*, 59, 96 (1975).
- Chen, R., B. Wittmann-Liebold, *FEBS Letters*, 52, 139 (1975).
- Chou, P. Y., G. D. Fasman, *Biochemistry*, 13, 211 (1974a).
- Chou, P. Y., G. D. Fasman, *Biochemistry*, 13, 222 (1974b).
- Clegg, C., D. H. Hayes, *Eur. J. Biochem.*, 42, 21 (1974).
- Cotter, R. I., W. B. Gratzer, *Nature*, 221, 154 (1969).
- Cotter, R. I., W. B. Gratzer, *Eur. J. Biochem.*, 23, 468 (1971).
- Cotter, R. I., P. McPhie, W. B. Gratzer, *Nature*, 216, 864 (1967).
- Cox, R. A., *Biochem. J.*, 98, 841 (1966).
- Craven, G. R., V. Gupta, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 67, 1329 (1970).

- Craven, G. R., B. Rigby, L.-M. Chanchien, in: Ribosomes, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 559 (1974).
- Craven, G. R., P. Voynow, S. J. S. Hardy, C. G. Kurland, Biochemistry, 8, 2906 (1969).
- Crichton, R. R., H. G. Wittmann, Mol. Gen. Genet., 114, 95 (1971).
- Crick, F. H. C., Symp. Soc. Exptl. Biol., 12, 138 (1958).
- Crumpton, M. J., in: Protein-Protein Interactions, Herausg.: R. Jaenicke, E. Helmreich, 23. Colloquium Ges. Biol. Chem., Springer-Vlg. (Berlin, Heidelberg, New York), 395 (1972).
- Cuatrecasas, P., in: Advances in Enzymology, 36, 29 (1972).
- Czernilofsky, A. P., E. E. Collatz, G. Stöffler, E. Kuchler, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 230 (1974a).
- Czernilofsky, A. P., C. G. Kurland, G. Stöffler, FEBS Letters, 58, 281 (1975).
- Czernilofsky, A. P., G. Stöffler, E. Kuchler, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 89 (1974b).
- Dahlberg, A. E., J. Biol. Chem., 249, 7673 (1974).
- Dahlberg, A. E., J. E. Dahlberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 72, 2940 (1975).
- Davies, D. R., V. R. Sarma, L. W. Labaw, E. V. Silvertown, W. D. Terry, in: The Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins, Herausg.: B. Amos, Academic Press (New York, London), 27 (1971).
- Davies, G. E., G. R. Stark, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 66, 651 (1970).
- Davies, J., W. Gilbert, L. Gorini, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 51, 883 (1964).
- Davies, J., L. Gorini, B. D. Davis, Mol. Pharmacol., 1, 93 (1965).
- Daya-Grosjean, L., J. Reinbolt, O. Pongs, R. A. Garrett, FEBS Letters, 44, 253 (1974).
- Debey, P., G. H. B. Hoa, P. Douzou, T. Godefroy-Colburn, M. Graffe, M. Grunberg-Manago, Biochemistry, 14, 1553 (1975).
- Dekio, S., R. Takata, Mol. Gen. Genet., 105, 219 (1969).
- Dekio, S., R. Takata, S. Osawa, K. Tanaka, M. Tamaki, Mol. Gen. Genet., 107, 39 (1970).

- Deusser, E., Mol. Gen. Genet., 119, 249 (1972).
- Deusser, E., G. Stöffler, H. G. Wittmann, D. Apirion, Mol. Gen. Genet., 109, 298 (1970).
- Deusser, E., H. G. Wittmann, Nature, 238, 269 (1972).
- DeWilde, M., B. Wittmann-Liebold, Mol. Gen. Genet., 127, 273 (1973).
- Dietrich, S., I. Schrandt, K. H. Nierhaus, FEBS Letters, 47, 136 (1974).
- Donner, D., C. G. Kurland, Mol. Gen. Genet., 115, 49 (1972).
- Dovgas, N. V., L. F. Markova, T. A. Mednikova, L. M. Vinokurov, Yu. B. Alakhov, Yu. A. Ovchinnikov, FEBS Letters, 53, 351 (1975).
- Dunker, A. K., R. R. Rueckert, J. Biol. Chem., 244, 5074 (1969).
- Dzionara, M., FEBS Letters, 8, 197 (1970).
- Dzionara, M., E. Kaltschmidt, H. G. Wittmann, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 67, 1909 (1970).
- Edelstein, S. J., Ann. Rev. Biochem., 44, 209 (1975).
- Ehresmann, C., P. Stiegler, P. Fellner, J. P. Ebel, Biochimie, 54, 901 (1972).
- Ehresmann, C., P. Stiegler, G. A. Mackie, R. A. Zimmermann, J. P. Ebel, P. Fellner, Nucleic Acids Research, 2, 265 (1975).
- Eilat, D., M. Pellegrini, H. Oen, N. de Groot, Y. Lapidot, C. R. Cantor, Nature, 250, 514 (1974a).
- Eilat, D., M. Pellegrini, H. Oen, Y. Lapidot, C. R. Cantor, J. Mol. Biol., 88, 831 (1974b).
- Eisen, H. N., in: Microbiology, Herausg.: B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, W. B. Wood, 2. Ausgabe, Harper International Edition, Medical Department (Harper & Row, Publishers, Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, London) S. 349 (1973).
- Erdmann, V. A., M. Sprinzl, O. Pongs, Biochem. Biophys. Res. Comm., 54, 942 (1973).
- Engelman, D. M., P. B. Moore, B. P. Schoenborn, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 72, 3888 (1975).
- Expert-Bezançon, A., D. Barritault, Abstracts of symposia, colloquia and poster-contributions presented at the tenth meeting of the Federation of European Biochemical Societies in Paris, July 1975, Abstract No. 443.

- Fakunding, J. L., R. R. Traut, J. W. B. Hershey, J. Biol. Chem., 248, 8555 (1973).
- Fellner, P., in: Ribosomes, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 169 (1974).
- Fellner, P., C. Ehresmann, J. P. Ebel, Biochimie, 54, 853 (1972).
- Finch, J. T., A. Klug, J. Mol. Biol., 13, 1 (1965).
- Fiser, I., K. H. Scheit, G. Stöffler, E. Kückler, Biochem. Biophys. Res. Comm., 60, 1112 (1974).
- Fiser, I., K. H. Scheit, G. Stöffler, E. Kückler, FEBS Letters, 56, 226 (1975).
- Franz, A., H. H. Paradies, Eur. J. Biochem., im Druck (1976).
- Funatsu, G., K. H. Nierhaus, H. G. Wittmann, Biochim. Biophys. Acta, 287, 282 (1972a).
- Funatsu, G., K. H. Nierhaus, B. Wittmann-Liebold, J. Mol. Biol., 64, 201 (1972b).
- Funatsu, G., W. Puls, E. Schiltz, J. Reinbolt, H. G. Wittmann, Mol. Gen. Genet., 115, 131 (1972c).
- Funatsu, G., E. Schiltz, H. G. Wittmann, Mol. Gen. Genet., 114, 106 (1971).
- Funatsu, G., H. G. Wittmann, J. Mol. Biol., 68, 547 (1972).
- Garrett, R. A., S. Müller, P. Spierer, R. A. Zimmermann, J. Mol. Biol., 88, 553 (1974).
- Garrett, R. A., K. H. Rak, L. Daya, G. Stöffler, Mol. Gen. Genet., 114, 112 (1971).
- Garrett, R. A., H. G. Wittmann, in: Advances in Protein Chemistry, Herausg.: C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, Academic Press (New York, London), 27, 278 (1973a).
- Garrett, R. A., H. G. Wittmann, in: Protein Synthesis in Reproductive Tissue, Herausg.: E. Diczfalussy, Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, Karolinska Institutet (Stockholm), 75 (1973b).
- Gaunt-Klopfer, M., V. A. Erdmann, Biochim. Biophys. Acta, 390, 226 (1975).
- Garvin, R. T., D. K. Biswas, L. Gorini, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 3814 (1974).

- Gavrilova, L. P., A. S. Spirin, *FEBS Letters*, 39, 13 (1974).
- Geisser, M., G. W. Tischendorf, G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.*, 127, 129 (1973).
- Gesteland, R. F., *J. Mol. Biol.*, 16, 67 (1966).
- Gesteland, R. F., T. Staehelin, *J. Mol. Biol.*, 24, 149 (1967).
- Gilbert, W., *J. Mol. Biol.*, 6, 374 (1963).
- Ginzburg, I., R. Miskin, A. Zamir, *J. Mol. Biol.*, 79, 481 (1973).
- Ginzburg, I., A. Zamir, *J. Mol. Biol.*, 93, 465 (1975).
- Gorini, L., in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 791 (1974).
- Gorini, L., W. Gundersen, M. Burger, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 31, 657 (1961).
- Gray, P. N., G. Bellemare, R. Monier, R. A. Garrett, G. Stöffler, *J. Mol. Biol.*, 77, 133 (1973).
- Gray, P. N., R. Monier, *Biochimie*, 54, 41 (1972).
- Green, M., C. G. Kurland, *Mol. Biol. Rep.*, 1, 105 (1973).
- Grunberg-Manago, M., J. Dondon, M. Graffe, *FEBS Letters*, 22, 217 (1972).
- Grunberg-Manago, M., Th. Godefroy-Colburn, A. D. Wolfe, P. Dessen, D. Pantaloni, M. Springer, M. Graffe, J. Dondon, A. Kay, in: *Regulation of Transcription and Translation in Eukaryotes*, Herausg.: E. K. F. Bautz, P. Karlson, H. Kersten, 24. Mosbacher Colloquium Ges. Biol. Chemie, Springer-Vlg. (Berlin, Heidelberg, New York), 213 (1973).
- Haenni, A. L., in: *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, Herausg.: L. Bosch, *Frontiers of Biology*, North-Holland Publ. Co. (Amsterdam, London), 27, 30 (1972).
- Hall, C. E., H. S. Slayter, *J. Mol. Biol.*, 1, 329 (1959).
- Hamel, E., M. Koka, T. Nakamoto, *J. Biol. Chem.*, 247, 805 (1972).
- Hardy, S. J. S., *Mol. Gen. Genet.*, 140, 253 (1975).
- Hardy, S. J. S., C. G. Kurland, P. Voynow, G. Mora, *Biochemistry*, 8, 2897 (1969).
- Harris, R. J., P. Greenwell, R. H. Symons, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 55, 117 (1973).



- Hart, R. G., *Biochim. Biophys. Acta*, 60, 629 (1962).
- Haselkorn, R., L. B. Rothman-Denes, *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 397 (1973).
- Hasenbank, R., C. Guthrie, G. Stöffler, H. G. Wittmann, L. Rosen, D. Apirion, *Mol. Gen. Genet.*, 127, 1 (1973).
- Hashimoto, K., *Genetics*, 45, 49 (1960).
- Hauptmann, R., A. P. Czernilofsky, H. O. Voorma, G. Stöffler, E. Kuchler, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 56, 331 (1974).
- Hawley, D. A., L. I. Slobin, A. J. Wahba, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 61, 544 (1974).
- Heidelberger, M., *Bact. Rev.*, 3, 49 (1935).
- Held, W. A., B. Ballou, S. Mizushima, M. Nomura, *J. Biol. Chem.*, 249, 3103 (1974).
- Held, W. A., S. Mizushima, M. Nomura, *J. Biol. Chem.*, 248, 5720 (1973).
- Highland, J. H., J. W. Bodley, J. Gordon, R. Hasenbank, G. Stöffler, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 142 (1973).
- Highland, J. H., G. A. Howard, *J. Biol. Chem.*, 250, 831 (1975).
- Highland, J. H., G. A. Howard, E. Ochsner, G. Stöffler, R. Hasenbank, J. Gordon, *J. Biol. Chem.*, 250, 1141 (1975).
- Highland, J. H., L. Lin, J. W. Bodley, *Biochemistry*, 10, 4404 (1971).
- Highland, J. H., E. Ochsner, J. Gordon, J. W. Bodley, R. Hasenbank, G. Stöffler, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 627 (1974a).
- Highland, J. H., E. Ochsner, J. Gordon, R. Hasenbank, G. Stöffler, *J. Mol. Biol.*, 86, 175 (1974b).
- Higo, K., W. Held, L. Kahan, M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 944 (1973).
- Hill, W. E., R. J. Fessenden, *J. Mol. Biol.*, 90, 719 (1974).
- Hill, W. E., G. P. Rosetti, K. E. van Holde, *J. Mol. Biol.*, 44, 263 (1969a).
- Hill, W. E., J. D. Thompson, J. W. Anderegg, *J. Mol. Biol.*, 44, 89 (1969b).
- Hindennach, I., E. Kaltschmidt, H. G. Wittmann, *Eur. J. Biochem.*, 23, 12 (1971b).
- Hindennach, I., G. Stöffler, H. G. Wittmann, *Eur. J. Biochem.*, 23, 7 (1971a).
- Hitz, H., D. Schäfer, B. Wittmann-Liebold, *FEBS Letters*, 56, 259 (1975).

- Homann, H., K. H. Nierhaus, *Eur. J. Biochem.*, 20, 249 (1971).
- Horne, J. R., V. A. Erdmann, *Mol. Gen. Genet.*, 119, 337 (1972).
- Horne, J. R., V. A. Erdmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 2870 (1973).
- Hosokawa, K., R. K. Fujimura, M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 55, 198 (1966).
- Howard, G. A., J. Gordon, *FEBS Letters*, 48, 271 (1974).
- Hsiung, N., C. R. Cantor, *Arch. Biochem. Biophys.*, 157, 125 (1973).
- Hsiung, N., S. A. Reines, C. R. Cantor, *J. Mol. Biol.*, 88, 841 (1974).
- Huang, K.-H., C. R. Cantor, *J. Mol. Biol.*, 67, 265 (1972).
- Huang, K.-H., R. H. Fairclough, C. R. Cantor, *J. Mol. Biol.*, 97, 443 (1975).
- Hultin, I., U. Östner, *Biochim. Biophys. Acta*, 160, 229 (1968).
- Humphrey, J. H., R. G. White, *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, Georg Thieme Vlg. (Stuttgart) (1972).
- Huxley, H. E., G. Zubay, *J. Mol. Biol.*, 2, 10 (1960).
- Isono, K., S. Isono, G. Stöffler, L. P. Visentin, M. Yaguchi, A. T. Matheson, *Mol. Gen. Genet.*, 127, 191 (1973).
- Itoh, T., E. Otaka, S. Osawa, *J. Mol. Biol.*, 33, 109 (1968).
- Itoh, T., H. G. Wittmann, *Mol. Gen. Genet.*, 127, 19 (1973).
- Kabat, E. A., *J. Immun.*, 97, 1 (1966).
- Kabat, E. A., *Einführung in die Immunchemie und Immunologie*, Heidelberger Taschenbücher, 79, Springer-Vlg. (Berlin, Heidelberg, New York) (1971).
- Kahan, L., W. A. Held, M. Nomura, *J. Mol. Biol.*, 88, 797 (1974).
- Kahan, L., E. Kaltschmidt, *Biochemistry*, 11, 2691 (1972).
- Kaltschmidt, E., *Analyt. Biochem.*, 43, 25 (1971).
- Kaltschmidt, E., M. Dzionara, H. G. Wittmann, *Mol. Gen. Genet.*, 109, 292 (1970).
- Kaltschmidt, E., H. G. Wittmann, *Analyt. Biochem.*, 36, 401 (1970a).
- Kaltschmidt, E., H. G. Wittmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 67, 1276 (1970b).
- Kay, A., G. Sander, M. Grunberg-Manago, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 51, 979 (1973).

- Kenner, R. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 51, 932 (1973).
- Kischa, K., W. Möller, G. Stöffler, *Nature*, 233, 62 (1971).
- Kjelgaard, N. O., C. G. Kurland, *J. Mol. Biol.*, 6, 341 (1963).
- Kreider, G., B. L. Brownstein, *J. Mol. Biol.*, 61, 135 (1971).
- Kreider, G., B. L. Brownstein, *J. Bacteriol.*, 109, 780 (1972).
- Kurland, C. G., *J. Mol. Biol.*, 2, 83 (1960).
- Kurland, C. G., *J. Mol. Biol.*, 18, 90 (1966).
- Kurland, C. G., *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 377 (1972).
- Kurland, C. G., in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 309 (1974a).
- Kurland, C. G., *J. Supramol. Structure*, 2, 178 (1974b).
- Kurland, C. G., D. Donner, J. van Duin, M. Green, L. C. Lutter, L. Randall-Hazelbauer, H. W. Schaup, H. Zeichhardt, *FEBS Proc. 8th Meeting, Amsterdam*, 27, 225 (1972a).
- Kurland, C. G., M. Green, H. W. Schaup, D. Donner, L. C. Lutter, E. A. Birge, *Proc. 7th FEBS Meeting*, 23, 75 (1972b).
- Kurland, C. G., P. Voynow, S. J. S. Hardy, L. Randall, L. C. Lutter, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 34, 17 (1969).
- Lafferty, K. J., S. J. Oertelis, *Nature*, 192, 764 (1961).
- Lake, J. A., M. Pendergast, L. Kahan, M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 4688 (1974a).
- Lake, J. A., D. D. Sabatini, Y. Nonomura, in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 543 (1974b).
- Leboy, P. S., E. C. Cox, J. G. Flaks, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 52, 1367 (1964).
- Leder, Ph., in: *Advances in Protein Chemistry*, Herausg.: C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, Academic Press (New York, London), 27, 213 (1973).
- Lelong, J. C., D. Gros, F. Gros, A. Bollen, R. Maschler, G. Stöffler, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 248 (1974).
- Lerman, M. I., A. S. Spirin, L. P. Gavrilova, V. F. Golon, *J. Mol. Biol.*, 15, 268 (1966).

- Liljas, A., M. G. Rossmann, *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 457 (1974).
- Liou, Y.-F., M. Yoshikawa, N. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 65, 1096 (1975).
- Litman, D. J., C. R. Cantor, *Biochemistry*, 13, 512 (1974).
- Litman, D. J., C. C. Lee, C. R. Cantor, *FEBS Letters*, 47, 268 (1974).
- Lockwood, A. H., U. Maitra, N. Brot, H. Weissbach, *J. Biol. Chem.*, 249, 1213 (1974).
- Lubin, M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 61, 1454 (1968).
- Lucas-Lenard, J., F. Lipmann, *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 409 (1971).
- Lutter, L. C., PhD-Thesis, University of Wisconsin, USA (1973).
- Lutter, L. C., U. Bode, C. G. Kurland, G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.*, 129, 167 (1974a).
- Lutter, L. C., C. G. Kurland, *Nature New Biol.*, 243, 15 (1973).
- Lutter, L. C., F. Ortanderl, H. Fasold, *FEBS Letters*, 48, 288 (1974b).
- Lutter, L. C., H. Zeichhardt, C. G. Kurland, G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.*, 119, 357 (1972).
- Luzzatto, L., D. Apirion, D. Schlessinger, *J. Mol. Biol.*, 42, 315 (1969).
- Maassen, J. A., W. Möller, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 1277 (1974).
- Marcot-Queiroz, J., R. Monier, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 446 (1966).
- Marsh, R. C., A. Parmeggiani, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 151 (1973).
- Maschler, R., Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1973).
- McLachlan, A. D., M. F. Perutz, P. D. Pulsinelli, in: *Protein-Protein Interactions*, Herausg.: R. Jaenicke, E. Helmreich, 23. Colloquium Ges. Biol. Chem., Springer-Vlg. (Berlin, Heidelberg, New York), 91 (1972).
- Mc Phie, P., W. B. Gratzer, *Biochemistry*, 5, 1310 (1966).
- Melchers, F., G. Köhler, W. Messer, in: *Protein-Protein Interactions*, Herausg.: R. Jaenicke, E. Helmreich, 23. Colloquium Ges. Biol. Chemie, Springer-Vlg. (Berlin, Heidelberg, New York), 409 (1972).
- Meselson, M., M. Nomura, S. Brenner, C. Davern, D. Schlessinger, *J. Mol. Biol.*, 9, 696 (1964).
- Michalski, C. J., B. H. Sells, *Eur. J. Biochem.*, 49, 361 (1974).

- Michalski, C. J., B. H. Sells, *Eur. J. Biochem.*, 52, 385 (1975).
- Midgley, J. E. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 108, 310 (1965).
- Miller, D. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 752 (1972).
- Miller, R. V., P. S. Sypherd, *J. Mol. Biol.*, 78, 527 (1973a).
- Miller, R. V., P. S. Sypherd, *J. Mol. Biol.*, 78, 539 (1973b).
- Miskin, R., A. Zamir, D. Elson, *J. Mol. Biol.*, 54, 355 (1970).
- Mizushima, S., M. Nomura, *Nature*, 226, 1214 (1970).
- Modolell, J., B. Cabrer, A. Parmeggiani, D. Vasquez, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 68, 1796 (1971).
- Modolell, J., B. D. Davis, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 67, 1148 (1970).
- Modolell, J., D. Vasquez, *J. Biol. Chem.*, 248, 488 (1973).
- Möller, W., H. Castleman, C. P. Terhorst, *FEBS Letters*, 8, 192 (1970).
- Möller, W., A. Groene, C. P. Terhorst, R. Amons, *Eur. J. Biochem.*, 25, 5 (1972).
- Monier, R., in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 141 (1974).
- Monro, R. E., in: *Methods in Enzymology*, 20, 472 (1971).
- Moore, G., R. R. Crichton, *Biochem. J.*, 143, 607 (1974).
- Moore, P. B., *J. Mol. Biol.*, 60, 169 (1971).
- Moore, P. B., D. M. Engelmann, B. P. Schoenborn, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 172 (1974).
- Moore, P. B., D. M. Engelmann, B. P. Schoenborn, *J. Mol. Biol.*, 91, 101 (1975).
- Moore, V. G., R. E. Atchison, G. Thomas, M. Moran, H. F. Noller, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 72, 844 (1975).
- Mora, G., D. Donner, P. Thammana, L. C. Lutter, C. G. Kurland, G. R. Craven, *Mol. Gen. Genet.*, 112, 229 (1971).
- Morgan, J., R. Brimacombe, *Eur. J. Biochem.*, 37, 472 (1973).
- Morrison, C. A., Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1974).
- Morrison, C. A., R. A. Garrett, H. Zeichhardt, G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.*, 127, 359 (1973).

- Muto, A., C. Ehresmann, P. Fellner, R. A. Zimmermann, *J. Mol. Biol.*, 86, 411 (1974).
- Naaktgeboren, N., A. Vermaas, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.*, 57, 493 (1975).
- Newton, I., R. Brimacombe, *Eur. J. Biochem.*, 48, 513 (1974).
- Newton, I., J. Rinke, R. Brimacombe, *FEBS Letters*, 51, 215 (1975).
- Nierhaus, D., K. H. Nierhaus, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 2224 (1973).
- Nierhaus, K. H., F. Dohme, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 4713 (1974).
- Nierhaus, K. H., V. Montejo, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 1931 (1973).
- Nirenberg, M. W., J. H. Matthaei, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 47, 1588 (1961).
- Noll, H., M. Noll, B. Hapke, G. van Dieijen, in: *Regulation of Transcription and Translation in Eukaryotes*, Herausg.: E.K.F. Bautz, P. Karlson, H. Kersten, 24. Mosbacher Colloquium Ges. Biol. Chemie, Springer-Vlg. (Berlin, Heidelberg, New York), 257 (1973).
- Noller, H. F., J. B. Chaires, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 3115 (1972).
- Noller, H. F., C. Chang, G. Thomas, J. Aldridge, *J. Mol. Biol.*, 61, 669 (1971).
- Nomura, M., *Bacteriol. Rev.*, 34, 228 (1970).
- Nomura, M., *J. Supramol. Structure*, 2, 163 (1974).
- Nomura, M., *Science*, 179, 864 (1973).
- Nomura, M., V. A. Erdmann, *Nature*, 228, 744 (1970).
- Nomura, M., W. A. Held, in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 193 (1974).
- Nomura, M., S. Mizushima, M. Ozaki, P. Traub, C. V. Lowry, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 34, 49 (1969).
- Nomura, M., A. Tissières, P. Lengyel, *Ribosomes*, Cold Spring Harbor (New York) (1974).
- Oen, H., M. Pellegrini, C. R. Cantor, *FEBS Letters*, 45, 218 (1974).
- Oen, H., M. Pellegrini, D. Eilat, C. R. Cantor, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 2799 (1973).
- Okuyama, A., M. Yoshikawa, N. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 60, 1163 (1974).



- Otaka, E., T. Itoh, S. Osawa, K. Tanaka, M. Tamaki, *Mol. Gen. Genet.*, 114, 14 (1971).
- Otaka, E., H. Teraoko, M. Tamaki, K. Tanaka, S. Osawa, *J. Mol. Biol.*, 48, 499 (1970).
- Ouchterlony, O., *Prog. Allergy*, 5, 1 (1958).
- Ozaki, M., S. Mizushima, M. Nomura, *Nature*, 222, 333 (1969).
- Paradies, H. H., D. E. Kuckuk, G. Klotz, H. Zerban, E. Deusser, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355, 1557 (1974).
- Pellegrini, M., H. Oen, D. Eilat, C. R. Cantor, *J. Mol. Biol.*, 88, 809 (1974).
- Perutz, M. F., L. F. TenEyck, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 36, 295 (1971).
- Pestka, S., *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 697 (1971a).
- Pestka, S., *Ann. Rev. Microbiol.*, 25, 487 (1971b).
- Pestka, S., *J. Biol. Chem.*, 243, 4038 (1968).
- Pilz, I., O. Kratky, A. Licht, M. Sela, *Biochemistry*, 12, 4998 (1973).
- Poljak, R. J., L. M. Amzel, H. P. Avey, B. L. Chen, R. P. Phizackerley, F. Saul, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 3305 (1973).
- Pongs, O., R. Bald, V. A. Erdmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 2229 (1973a).
- Pongs, O., R. Bald, T. Wagner, V. A. Erdmann, *FEBS Letters*, 35, 137 (1973b).
- Pongs, O., V. A. Erdmann, *FEBS Letters*, 37, 47 (1973).
- Pongs, O., E. Lanka, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 449 (1975a).
- Pongs, O., E. Lanka, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 72, 1505 (1975b).
- Pongs, O., K. H. Nierhaus, V. A. Erdmann, H. G. Wittmann, *FEBS Letters*, 40, S28 (1974).
- Pongs, O., E. Rössner, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 1297 (1975).
- Pongs, O., G. Stöffler, E. Lanka, *J. Mol. Biol.*, 99, 301 (1975).
- Ramagopal, S., A. R. Subramanian, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 2136 (1974).
- Ramagopal, S., A. R. Subramanian, *J. Mol. Biol.*, 94, 633 (1975).

- Randall-Hazelbauer, L. L., C. G. Kurland, *Mol. Gen. Genet.*, 115, 234 (1972).
- Revel, M., in: *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, Herausg.: L. Bosch, *Frontiers in Biology*, North-Holland Publ. Co. (Amsterdam, London), 27, 87 (1972).
- Richman, N., J. W. Bodley, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 686 (1972).
- Richter, D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 46, 1850 (1972).
- Richter, D., V. A. Erdmann, M. Sprinzl, *Nature New Biol.*, 246, 132 (1973).
- Ritter, E., B. Wittmann-Liebold, *FEBS Letters*, 60, 153 (1975).
- Rombauts, W., B. Peeters, H. G. Wittmann, *FEBS Letters*, 18, 164 (1971).
- Ron, E. Z., R. E. Kohler, B. D. Davis, *Science*, 153, 1119 (1966).
- Rosset, R., R. Monier, *Biochim. Biophys. Acta*, 68, 653 (1963).
- Roth, H. E., K. H. Nierhaus, *FEBS Letters*, 31, 35 (1973).
- Roth, H. E., K. H. Nierhaus, *J. Mol. Biol.*, 94, 111 (1975).
- Rudland, P. S., B. F. C. Clark, in: *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, Herausg.: L. Bosch, *Frontiers in Biology*, North-Holland Publ. Co. (Amsterdam, London), 27, 55 (1972).
- Rummel, D. P., H. F. Noller, *Nature New Biol.*, 245, 72 (1973).
- Sander, G., R. C. Marsh, A. Parmeggiani, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 47, 866 (1972).
- Sarkar, P. K., J. T. Yang, P. Doty, *Biopolymers*, 5, 1 (1967).
- Sarma, V. R., E. W. Silverton, D. R. Davies, W. D. Terry, *J. Biol. Chem.*, 246, 3753 (1971).
- Schaup, H. W., M. Green, C. G. Kurland, *Mol. Gen. Genet.*, 109, 193 (1970).
- Schaup, H. W., M. Green, C. G. Kurland, *Mol. Gen. Genet.*, 112, 1 (1971).
- Schaup, H. W., C. G. Kurland, *Mol. Gen. Genet.*, 114, 350 (1972).
- Schaup, H. W., M. L. Sogin, C. G. Kurland, C. R. Woese, *J. Bact.*, 115, 82 (1973).
- Schendel, P., P. Maeba, G. R. Craven, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 544 (1972).
- Schiltz, E., J. Reinbolt, *Eur. J. Biochem.*, 56, 467 (1975).
- Schreiner, G., K. H. Nierhaus, *J. Mol. Biol.*, 81, 71 (1973).

- Schrier, P. I., J. A. Maassen, W. Möller, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 53, 90 (1973).
- Schwartz, I., J. Ofengand, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 3951 (1974).
- Scolnick, E., R. Tompkins, T. Caskey, M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 61, 768 (1968).
- Segal, D. M., E. A. Padlan, G. H. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter, D. R. Davies, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 4298 (1974).
- Sela, M., in: *The Harvay Lecture Series*, Academic Press (New York, London), 67, 213 (1973).
- Sela, M., *Adv. in Immun.*, 5, 29 (1966).
- Sela, M., *Science*, 166, 1365 (1969).
- Sela, M., *FEBS Letters*, 40, S85 (1974).
- Sela, M., B. Schechter, I. Schechter, F. Borek, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 32, 537 (1967).
- Sephadex: *Gel Filtration in Theory and Practice*, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden (1972).
- Sherman, M. I., M. V. Simpson, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 34, 220 (1969).
- Shih, C. Y. T., G. R. Craven, *J. Mol. Biol.*, 78, 651 (1973).
- Shine, J., L. Dalgarno, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 1342 (1974).
- Shine, J., L. Dalgarno, *Nature*, 254, 34 (1975a).
- Silman, I. H., E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.*, 35, 873 (1966).
- Slobin, L. I., *J. Mol. Biol.*, 64, 297 (1972).
- Smith, W. S., Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison (1971).
- Sommer, A., R. R. Traut, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 3946 (1974).
- Sommer, A., R. R. Traut, *J. Mol. Biol.*, 97, 471 (1975).
- Sonenberg, N., M. Wilchek, A. Zamir, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 1423 (1973).
- Sopori, M., M. Pellegrini, P. Lengyel, C. R. Cantor, *Biochemistry*, 13, 5432 (1974).
- Spierer, P., R. A. Zimmermann, G. A. Mackie, *Eur. J. Biochem.*, 52, 459 (1975).

- Spiess, E., *Cytobiologie*, 1, 28 (1973).
- Spirin, A. S., *FEBS Letters*, 40, S38 (1974).
- Spitnik-Elson, P., A. Breiman, *Biochim. Biophys. Acta*, 254, 457 (1971).
- Sprague, K. U., J. A. Steitz, *Nucleic Acids Research*, 2, 787 (1975).
- Stadler, H., *FEBS Letters*, 48, 114 (1974).
- Staehelein, T., D. Maglott, R. E. Monro, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 34, 39 (1969).
- Staehelein, T., M. Meselson, *J. Mol. Biol.*, 16, 245 (1966).
- Stanley, W. M. Jr., R. M. Bock, *Biochemistry*, 4, 1302 (1965).
- Stöffler, G., *Mol. Gen. Genet.*, 100, 374 (1967).
- Stöffler, G., in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 615 (1974).
- Stöffler, G., L. Daya, K. H. Rak, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.*, 62, 411 (1971a).
- Stöffler, G., L. Daya, K. H. Rak, R. A. Garrett, *Mol. Gen. Genet.*, 114, 125 (1971b).
- Stöffler, G., E. Deusser, H. G. Wittmann, D. Apirion, *Mol. Gen. Genet.*, 111, 334 (1971c).
- Stöffler, G., R. Hasenbank, J. W. Bodley, J. H. Highland, *J. Mol. Biol.*, 86, 171 (1974).
- Stöffler, G., R. Hasenbank, M. Lütgehaus, R. Maschler, C. A. Morrison, H. Zeichhardt, R. A. Garrett, *Mol. Gen. Genet.*, 127, 89 (1973).
- Stöffler, G., G. W. Tischendorf, in: *Topics in Infectious Diseases*, Vol. 1, Herausg.: J. Drews, F. E. Hahn, Springer-Vlg., Wien, New York, 117 (1975).
- Stöffler, G., H. G. Wittmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 68, 2283 (1971a).
- Stöffler, G., H. G. Wittmann, *J. Mol. Biol.*, 62, 407 (1971b).
- Subramanian, A. R., *J. Mol. Biol.*, 95, 1 (1975).
- Sun, T. T., A. Bollen, L. Kahan, R. R. Traut, *Biochemistry*, 13, 2334 (1974a).
- Sun, T. T., R. R. Traut, L. Kahan, *J. Mol. Biol.*, 87, 509 (1974b).
- Svedberg, T., K. O. Pedersen, *Die Ultrazentrifuge*, Handbuch der Kolloidwissenschaft in Einzeldarstellung, Bd. VII, Theodor Steinkopff Vlg., Dresden und Leipzig (1940).

- Szer, W., J. M. Hermoso, S. Leffler, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 72, 2325 (1975).
- Szer, W., S. Leffler, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 3611 (1974).
- Tal, M., M. Aviram, A. Kanarek, A. Weiss, Biochim. Biophys. Acta, 281, 381 (1972).
- Tanaka, N., H. Masukawa, U. Umezawa, Biochem. Biophys. Res. Comm., 26, 544 (1967).
- Tate, W. P., C. T. Caskey, G. Stöffler, J. Mol. Biol., 93, 375 (1975).
- Terhorst, C. P., W. Möller, R. Laursen, B. Wittmann-Liebold, Eur. J. Biochem., 34, 138 (1973).
- Thammana, P., C. G. Kurland, E. Deusser, J. Weber, R. Maschler, G. Stöffler, H. G. Wittmann, Nature New Biol., 242, 47 (1973).
- Thomas, G. J., Biopolymers, 7, 325 (1969).
- Tischendorf, G. W., M. Geisser, G. Stöffler, Mol. Gen. Genet., 127, 147 (1973).
- Tischendorf, G. W., G. Stöffler, Mol. Gen. Genet., 142, 193 (1975).
- Tischendorf, G. W., H. Zeichhardt, G. Stöffler, Mol. Gen. Genet., 134, 187 (1974a).
- Tischendorf, G. W., H. Zeichhardt, G. Stöffler, Mol. Gen. Genet., 134, 209 (1974b).
- Tischendorf, G. W., H. Zeichhardt, G. Stöffler, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 72, 4820 (1975).
- Tissières, A., J. D. Watson, D. Schlessinger, B. R. Hollingworth, J. Mol. Biol., 1, 221 (1959).
- Tolbert, W. R., Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison (1971).
- Traub, P., K. Hosokawa, G. R. Craven, M. Nomura, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 58, 2430 (1967).
- Traub, P., M. Nomura, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 59, 777 (1968).
- Traub, P., M. Nomura, Cold Spring Harb. Symp. Biol., 34, 63 (1969).
- Traut, R. R., H. Delius, C. Ahmad-Zadeh, T. A. Bickle, P. Pearson, A. Tissières, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 34, 25 (1969).

Traut, R. R., R. L. Heimark, T. T. Sun, J. W. B. Hershey, A. Bollen, in: Ribosomes, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 271 (1974).

Uhr, J. W., M. S. Finkelstein, Progr. Allergy, 10, 43 (1967).

Ungewickell, E., R. A. Garrett, C. Ehresmann, P. Stiegler, P. Fellner, Eur. J. Biochem., 51, 165 (1975).

Valentine, R. C., N. M. Green, J. Mol. Biol., 27, 615 (1967).

Valentine, R. C., B. M. Shapiro, E. R. Stadtman, Biochemistry, 7, 2143 (1968).

van Acken, U., Mol. Gen. Genet., 140, 61 (1975).

Vandekerckhove, J., W. Rombauts, B. Peeters, B. Wittmann-Liebold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem., 356, 1955 (1975).

van Dieijen, G., C. J. van der Laken, P. H. van Knippenberg, J. van Duin, J. Mol. Biol., 93, 351 (1975).

van Duin, J., C. G. Kurland, Mol. Gen. Genet., 109, 169 (1970).

van Duin, J., P. H. van Knippenberg, J. Mol. Biol., 84, 185 (1974).

van Duin, J., P. H. van Knippenberg, M. Dieben, C. G. Kurland, Mol. Gen. Genet., 116, 181 (1972).

van Duin, J., C. G. Kurland, J. Dondon, M. Grunberg-Manago, FEBS Letters, 59, 287 (1975).

van Knippenberg, P. H., Nucleic Acids Research, 2, 79 (1975).

van Holde, K. E., W. E. Hill, in: Ribosomes, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), 53 (1974).

Vasquez, D., FEBS Letters, 40, S63 (1974).

Visentin, L. P., M. Yaguchi, H. Kaplan, Can. J. Biochem., 51, 1487 (1973).

Voynow, P., C. G. Kurland, Biochemistry, 10, 517 (1971).

Wabl, M. R., Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1973).

Wabl, M. R., J. Mol. Biol., 84, 241 (1974).

Wabl, M. R., P. J. Barends, N. Nanninga, Cytobiologie, 7, 1 (1973a).

Wabl, M. R., H. G. Doberer, S. Höglund, L. Ljung, Cytobiologie, 7, 111 (1973b).



- Watson, J. D., *Molecular Biology of the Gene*, W. A. Benjamin, Inc. (New York) (1970).
- Weber, H. J., *Mol. Gen. Genet.*, 119, 233 (1972).
- Weissbach, H., B. Redfield, E. Yamasaki, R. C. Davis, Jr., S. Pestka, N. Brot, *Arch. Biochem. Biophys.*, 149, 110 (1972).
- Werner, T. C., J. R. Bunting, R. E. Cathou, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 795 (1972).
- Wishnia, A., A. Bousset, M. Graffe, Ph. Dessen, M. Grunberg-Manago, *J. Mol. Biol.*, 93, 499 (1975).
- Wittmann, H. G., *FEBS Proc. 8th Meeting, Amsterdam*, 27, 213 (1972).
- Wittmann, H. G., in: *Ribosomes, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel*, Cold Spring Harbor (New York), 93 (1974).
- Wittmann, H. G., G. Stöffler, in: *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation, Herausg.: L. Bosch, Frontiers in Biology, North-Holland Publ. Co. (Amsterdam, London)*, 27, 285 (1972).
- Wittmann, H. G., G. Stöffler, D. Apirion, L. Rosen, K. Tanaka, M. Tamaki, R. Takata, S. Dekio, E. Otaka, S. Osawa, *Mol. Gen. Genet.*, 127, 175 (1973).
- Wittmann, H. G., G. Stöffler, I. Hindennach, C. G. Kurland, L. Randall-Hazelbauer, E. A. Birge, M. Nomura, E. Kaltschmidt, S. Mizushima, R. R. Traut, T. A. Bickle, *Mol. Gen. Genet.*, 111, 327 (1971).
- Wittmann, H. G., G. Stöffler, W. Piepersberg, P. Buckel, D. Ruffler, A. Böck, *Mol. Gen. Genet.*, 134, 225 (1974).
- Wittmann, H. G., B. Wittmann-Liebold, in: *Ribosomes, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel*, Cold Spring Harbor (New York), 115 (1974).
- Wittmann-Liebold, B., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354, 1415 (1973a).
- Wittmann-Liebold, B., *FEBS Letters*, 36, 247 (1973b).
- Wittmann-Liebold, B., B. Greuer, R. Pannenbecker, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 1977 (1975).
- Wold, F., in: *Methods in Enzymology*, 11, 617 (1967).
- Wong, K. P., H. H. Paradies, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 61, 178 (1974).
- Yaguchi, M., *FEBS Letters*, 59, 217 (1975).
- Yaguchi, M., A. T. Matheson, L. P. Visentin, *FEBS Letters*, 46, 296 (1974).

Yu, R. S. T., H. G. Wittmann, *Biochim. Biophys. Acta*, 324, 375 (1973).

Yuki, A., R. Brimacombe, *Eur. J. Biochem.*, 56, 23 (1975).

Zamir, A., R. Miskin, D. Elson, *J. Mol. Biol.*, 60, 347 (1971).

Zamir, A., R. Miskin, Z. Vogel, D. Elson, in: *Methods Enzymology*, 30, 406 (1974).

Zeichhardt, H., *Diplomarbeit, Freie Universität Berlin* (1974).

Zillig, W., K. Zechel, D. Rabussay, M. Schachner, V. S. Sethi, P. Palm, A. Heil, W. Seifert, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 35, 47 (1970).

Zimmermann, R. A., in: *Ribosomes*, Herausg.: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel, *Cold Spring Harbor (New York)*, 225 (1974).

Zimmermann, R. A., R. T. Garvin, L. Gorini, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 68, 2263 (1971).

Zimmermann, R. A., Y. Ikeya, F. Sparling, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70, 71 (1973).

Zimmermann, R. A., G. A. Mackie, A. Muto, R. A. Garrett, E. Ungewickell, C. Ehresmann, P. Stiegler, J.-P. Ebel, P. Fellner, *Nucleic Acids Research*, 2, 279 (1975).

Zimmermann, R. A., A. Muto, P. Fellner, C. Ehresmann, C. Branlant, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 1282 (1972).

Zimmermann, R. A., A. Muto, G. A. Mackie, *J. Mol. Biol.*, 86, 433 (1974).

#### Nachtrag:

Helser, T. L., J. E. Davies, J. E. Dahlberg, *Nature New Biol.*, 233, 12 (1971).

Helser, T. L., J. E. Davies, J. E. Dahlberg, *Nature New Biol.*, 235, 6 (1972).

Isono, S., K. Isono, *Eur. J. Biochem.*, 56, 15 (1975).

Kim, S. H., J. L. Sussman, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, A. H. J. Wang, N. C. Seemann, A. Rich, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 4970 (1974).

Robertus, J. D., J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. S. Brown, B. F. C. Clark, A. Klug, *Nature*, 250, 546 (1974).

Shine, J., L. Dalgarno, *Eur. J. Biochem.*, 57, 221 (1975b).

van Duin, J., C. G. Kurland, J. Dondon, M. Grunberg-Manago, C. Branlant, J. P. Ebel, FEBS Letters, 62, 111 (1976).

Wittmann-Liebold, B., M. Dzionara, FEBS Letters, 61, 14 (1976).





|           |     |    |     |         |     |    |     |
|-----------|-----|----|-----|---------|-----|----|-----|
| Abbildung | 1   | S. | 29  | Tabelle | 1   | S. | 49  |
| "         | 2   |    | 29  | "       | 2   |    | 55  |
| "         | 3   |    | 48  | "       | 3   |    | 57  |
| "         | 4   |    | 53  | "       | 4   |    | 60  |
| "         | 5   |    | 68  | "       | 5   |    | 64  |
| "         | 6   |    | 69  | "       | 6   |    | 66  |
| "         | 7   |    | 74  | "       | 7   |    | 71  |
| "         | 8   |    | 77  | "       | 8   |    | 78  |
| "         | 9   |    | 89  | "       | 9   |    | 79  |
| "         | 10  |    | 90  | "       | 10  |    | 82  |
| "         | 11  |    | 104 | "       | 11  |    | 84  |
| "         | 12  |    | 105 | "       | 12  |    | 87  |
| "         | 13  |    | 142 | "       | 13  |    | 92  |
| "         | 14  |    | 142 | "       | 14  |    | 93  |
| "         | 15  |    | 142 | "       | 15  |    | 97  |
| "         | 16  |    | 146 | "       | 16  |    | 99  |
| "         | 17  |    | 146 | "       | 17  |    | 102 |
| "         | 18  |    | 148 | "       | 18  |    | 109 |
| "         | 19  |    | 151 | "       | 19  |    | 112 |
| "         | 20  |    | 154 | "       | 20  |    | 114 |
| "         | 21a |    | 184 | "       | 21  |    | 120 |
| "         | 21b |    | 184 | "       | 22  |    | 133 |
| "         | 22  |    | 187 | "       | 23  |    | 134 |
| "         | 23  |    | 188 | "       | 24  |    | 138 |
| "         | 24  |    | 190 | "       | 25  |    | 158 |
| "         | 25  |    | 191 | "       | 26  |    | 172 |
| "         | 26  |    | 194 | "       | 27a |    | 230 |
| "         | 27  |    | 194 | "       | 27b |    | 232 |
| "         | 28  |    | 195 | "       | 28  |    | 235 |
| "         | 29  |    | 197 | "       | 29  |    | 241 |
| "         | 30  |    | 197 | "       | 30  |    | 250 |
| "         | 31  |    | 199 | "       | 31  |    | 251 |
| "         | 32  |    | 200 | "       | 32  |    | 257 |
| "         | 33  |    | 202 | "       | 33  |    | 260 |
| "         | 34  |    | 203 | "       | 34  |    | 263 |
| "         | 35  |    | 203 |         |     |    |     |
| "         | 36  |    | 206 |         |     |    |     |
| "         | 37  |    | 206 |         |     |    |     |
| "         | 38  |    | 207 |         |     |    |     |
| "         | 39  |    | 209 |         |     |    |     |
| "         | 40  |    | 210 |         |     |    |     |
| "         | 41  |    | 211 |         |     |    |     |
| "         | 42  |    | 212 |         |     |    |     |
| "         | 43  |    | 217 |         |     |    |     |
| "         | 44  |    | 218 |         |     |    |     |
| "         | 45  |    | 226 |         |     |    |     |
| "         | 46  |    | 247 |         |     |    |     |
| "         | 47  |    | 247 |         |     |    |     |
| "         | 48  |    | 256 |         |     |    |     |

G. Seitenverzeichnis für  
Abbildungen und Tabellen



## D a n k s a g u n g

Die vorliegende Arbeit habe ich im wesentlichen am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin (Abteilung Prof. Wittmann) angefertigt. Herrn Prof. Dr. H. G. Wittmann danke ich für die großzügige Unterstützung während meiner Tätigkeit am Max-Planck-Institut. Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Stöffler, der mich zu dieser Arbeit anregte, mich bei meinen Untersuchungen anleitete und hilfreich unterstützte. Herrn Dr. G. W. Tischendorf danke ich für gute Kooperation und wertvolle Diskussionen. Allen Mitarbeitern des Instituts, vor allem denen der Arbeitsgruppe Dr. Stöffler, gilt mein Dank für ständige Hilfsbereitschaft.

Einige Untersuchungen der Arbeit führte ich am Wallenberg Labor (Institut für Molekularbiologie) der Universität Uppsala/Schweden durch. Herrn Prof. Dr. C. G. Kurland danke ich für Unterstützung und Anleitung während dieser Zeit, Herrn Dr. L. C. Lutter für gutes Zusammenwirken und allen Mitarbeitern des Instituts für freundliches Entgegenkommen.

Für einen Teil der Versuche wurden technische Einrichtungen am Institut für klinische und experimentelle Virologie in Berlin zur Verfügung gestellt. Herrn Prof. Dr. K.-O. Habermehl und Herrn Prof. Dr. W. Diefenthal danke ich dafür.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes gilt mein Dank für die Förderung während meines Studiums, insbesondere für die Gewährung eines einjährigen Auslandsstipendiums.

Der Ernst-Reuter-Gesellschaft der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V. danke ich für die Bewilligung eines Zuschusses zu den Druckkosten für diese Arbeit.



## H. Lebenslauf

Am 10. Juni 1950 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Franz Zeichhardt und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Wegener, in Berlin geboren. Hier besuchte ich von 1956 bis 1962 die Grundschule und anschließend den neusprachlichen Zug der Hermann-Ehlers-Oberschule. Nach dem Abitur im Frühjahr 1969 nahm ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Biologie auf. Während dieser Zeit war ich von 1970 bis 1974 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes. Mit Abgabe meiner schriftlichen Diplomarbeit, die ich am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin anfertigte, erwarb ich im April 1974 mein Diplom (mit Auszeichnung).

Im Herbst 1971 ließ ich mich für zwei Semester an der Freien Universität beurlauben, um am Wallenberg Labor (Institut für Molekularbiologie) der Universität Uppsala/Schweden bei Prof. Dr. C. G. Kurland zu studieren.

Am 6. Juli 1973 heiratete ich die Graphik-Designerin Christiane Mewes.

Meine Dissertationsarbeit besteht aus Studien während meines Auslandsaufenthaltes und Untersuchungen, die ich seit Februar 1973 unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. G. Stöffler am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Abteilung Prof. Wittmann) durchführte.

Heinz Zeichhardt







